

LINDA AMTSFELD

Etablierung und Charakterisierung eines genetisch
induzierten Mausmodells des kolorektalen Karzinoms



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique 
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere
Fachbereich Chirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer
und

aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Betreuer: PD Dr. Sebastian Schölch

Etablierung und Charakterisierung eines genetisch induzierten Mausmodells des kolorektalen Karzinoms

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Linda Amtsfeld, geb. Blickensdörfer

Tierärztin aus Ludwigshafen

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

1. Gutachter:	Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer
2. Gutachter:	PD Dr. Sebastian Schölch
Prüfer:	Prof. Dr. Joachim Roth

Tag der Disputation: 03. November 2017

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung	10
2. Literaturübersicht.....	11
2.1. Das kolorektale Karzinom.....	11
2.1.1. Karzinogenese	11
2.1.2. Adenom-Karzinom-Sequenz	12
2.1.2.1. Adenomatous-polyposis-coli (APC)-Gen.....	13
2.1.2.2. V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS-Gen).....	13
2.1.2.3. TP53-Tumorsuppressor-Gen	14
2.2. Mausmodelle.....	16
2.3. Genetisch induzierte Mausmodelle (GEMM)	17
2.4. Anwendung für diese Arbeit	18
2.5. Cre/lox P System.....	19
2.6. Adenovirus	21
2.7. Onkologie Veterinärmedizin	22
2.8. Ziel der Dissertation	25
3. Material und Methoden.....	26
3.1. Mausstämme.....	26
3.2. Genotypisierung	28
3.3. Viruspropagation Ad5CMVCre	31
3.4. TCID 50.....	33
3.5. Infektion des Kolons mit Adeno-Cre	34
3.6. Koloskopie.....	36
3.7. Statistik	37
3.8. Probengewinnung und Aufbereitung.....	38
4. Ergebnisse	39
5. Diskussion.....	53
6. Zusammenfassung.....	59
7. Summary.....	61
8. Literaturverzeichnis	63
9. Anhang.....	76

9.1. Equipment	76
9.2. Chemikalien	77
9.3. Enzyme	78
10. Danksagung	79
11. Eidesstattliche Erklärung	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Adenom-Karzinom-Sequenz (Armaghany et al. 2012)	12
Abbildung 2 Das Cre/loxP-System.....	20
Abbildung 3 Koloskopie	40
Abbildung 4 Tumorentwicklung und T-Staging	48
Abbildung 5 Histologie.....	49
Abbildung 6 Differenzierungsgrad der Tumoren	50
Abbildung 7 Überlebenskurve.....	51
Abbildung 8 Präparation	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Tumorwachstum bei Apc-Mäusen nach 56 Tagen	41
Tabelle 2 Tumorwachstum bei AK-Mäusen nach 56 Tagen.....	41
Tabelle 3 Tumorwachstum bei AKPr-Mäusen nach 56 Tagen	42
Tabelle 4 Tumorwachstum bei AKPfl-Mäusen nach 56 Tagen.....	42
Tabelle 5 Tumorwachstum bei Apc-Mäusen nach 112 Tagen	43
Tabelle 6 Tumorwachstum bei AK-Mäusen nach 112 Tagen.....	44
Tabelle 7 Tumorwachstum bei AKPr-Mäusen nach 112 Tagen	44
Tabelle 8 Tumorwachstum bei AKPfl-Mäusen nach 112 Tagen.....	45
Tabelle 9 Tumorwachstum bei Apc-Mäusen nach 168 Tagen	46
Tabelle 10 Tumorwachstum bei AK-Mäusen nach 168 Tagen.....	46
Tabelle 11 Tumorwachstum bei AKPr-Mäusen nach 168 Tagen	47
Tabelle 12 Tumorwachstum bei AKPfl-Mäusen nach 168 Tagen.....	47

Abkürzungsverzeichnis

AdenoCre	Cre-exprimierendes Adenovirus
CAMs	cell adhesion molecules (Zelladhäsionsmoleküle)
CIN	chromosomal instability (chromosomale Instabilität)
Cre	cyclization recombination oder causes recombination
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat oder Ethylendiamintetraessigsäure
FAP	familial adenomatous polyposis (Familiäre adenomatöse Polyposis)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FED-PET	Fluordesoxyglucose - Positronen-Emissions-Tomographie
FGF1/2	fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
GEMM	genetically engineered mouse model (genetisch induziertes Mausmodell)
H/E	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer (hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom)
KRK	Kolorektales Karzinom
loxP	locus of crossing [x-ing]- over of bacteriophage P1
MMR	Mismatch repair genes (MismatchReparatur-Gene)
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
n	Anzahl
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
pfu	plaque forming unit (Plaques-bildenden Einheiten)
PDGF	platelet-derived growth factor (thrombozytärer Wachstumsfaktor)
pRb	Retinoblastoma Protein
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s.	siehe
s.u.	siehe unten
Taq	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TCID	tissue culture infective dose
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tu	Transducing Units
TGF α	tumor growth factor α (Tumorstufungsfaktor α)
TGF β	tumor growth factor β (Tumorstufungsfaktor β)
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vs	versus

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt mit einer jährlichen Inzidenz von 62 000 bei Männern und Frauen zu den häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt über alle Stadien hinweg bei ca. 60% (Kaatsch et al. 2015). Maßgeblich bestimmt wird die Prognose vom Stadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Da die Erkrankung anfangs symptomlos verläuft, können regelmäßige Vorsorgekoloskopien ab 55 Jahren die KRK-spezifische Morbidität und Mortalität deutlich senken (Weitz et al. 2005; Jemal et al. 2011; Kaatsch et al. 2015).

Die große Mehrheit der KRK entsteht auf dem Boden von Adenomen. Die Weiterentwicklung eines solchen Adenoms hin zum invasiven Karzinom hängt von der weiteren Akkumulation genetischer Veränderungen ab. Durch sequenziell auftretende, spontane Mutationen und den daraus resultierenden Funktionsverlusten in Tumorsuppressorgenen bzw. Aktivierung von Onkogenen entwickelt sich ein gut differenziertes Adenom über Jahre hinweg hin zum invasiven Karzinom, ein Vorgang, der als Adenom-Karzinom-Sequenz bekannt ist (Fearon und Vogelstein 1990; Hanahan und Weinberg 2000; Weitz et al. 2005; Brenner et al. 2007; Jemal et al. 2011). Die drei häufigsten Mutationen des KRK sind hierbei in APC, KRAS und TP53.

In der hier vorliegenden Arbeit soll ein genetisch induziertes Mausmodell des KRK, das die Tumorentstehung basierend auf Mutationen in APC, KRAS und TP53 nachstellt, etabliert und charakterisiert werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Das kolorektale Karzinom

2.1.1. Karzinogenese

Neben hereditären KRK-assoziierten Syndromen, zu denen im Wesentlichen das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) zählen, entwickelt sich die große Mehrzahl aller KRK spontan (Bates und Mercurio 2005; Weitz et al. 2005). Dabei entstehen zunächst adenomatöse Polypen, woraus sich im weiteren Verlauf Karzinome entwickeln können (Winawer et al. 1993; Weitz et al. 2005).

Biologisch kann das kolorektale Karzinom neben den hypermutierten, mikrosatelliteninstabilen Tumoren nach seiner Entstehung in verschiedene Subtypen eingeteilt werden (Armaghany et al. 2012). Im Nachfolgenden soll der häufigste Subtyp des KRK, basierend auf Mutationen in APC, KRAS und TP53 beschrieben werden. Dieser zeichnet sich aufgrund des Funktionsverlustes in TP53 durch hohe Mutationsraten aus und hat weitere, proliferationsinduzierte Mutationen APC und KRAS. Damit entspricht er dem klassischen, durch die Adenom-Karzinom-Sequenz entstandenen Kolonkarzinom. (Armaghany et al. 2012; Muzny et al. 2012).

2.1.2. Adenom-Karzinom-Sequenz

Die sequentielle Akkumulation genetischer Mutationen in einem kolorektalen Adenom und die daraus folgende schrittweise Entdifferenzierung wird als Adenom-Karzinom-Sequenz (Abbildung 1) bezeichnet (Vogelstein et al. 1988; Fearon und Vogelstein 1990; Armaghany et al. 2012) und wurde initial von Jackman und Mayo im Jahr 1951 beschrieben (Jackman und Mayo 1951). 85% aller kolorektalen Karzinome entstehen auf Basis der Adenom-Karzinom-Sequenz (Armaghany et al. 2012).

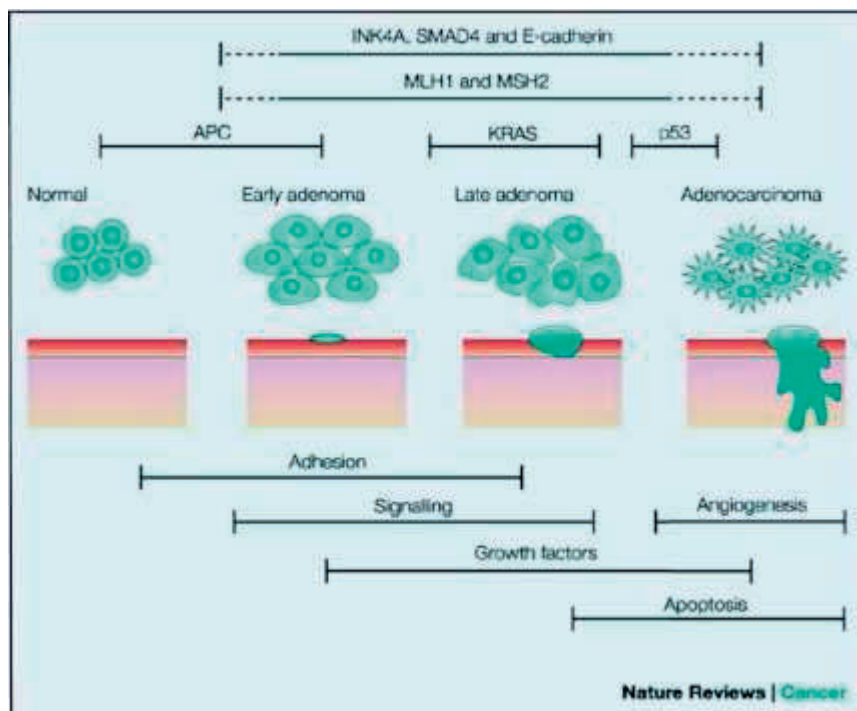


Abbildung 1 Adenom-Karzinom-Sequenz (Armaghany et al. 2012)

Die initiale Mutation ist hierbei meist eine inaktivierende Mutation des APC-Gens, welche durch die daraus folgende konstitutive Aktivierung des WNT-Signalwegs zur Bildung eines Adenoms führt; in 81% aller KRK kann eine APC-Mutation nachgewiesen werden. Im weiteren akkumulieren im Adenom weitere Mutationen, am häufigsten im TP53-Gen; die dritthäufigste Mutation liegt mit im KRAS-Gen (Muzny et al. 2012).

2.1.2.1. Adenomatous-polypsis-coli (APC)-Gen

Initialereignis der Adenom-Karzinom-Sequenz ist nahezu immer ein Funktionsverlust des APC-Gens (Powell et al. 1992); in über 80 % der KRK können Mutationen im APC-Gen nachgewiesen werden (Kinzler und Vogelstein 1996; Nandan und Yang 2010; Irving et al. 2014; Szylberg et al. 2015).

Das menschliche APC-Gen besteht aus 8535 Basenpaaren und umfasst 18 Exons. Es kodiert für ein 2843 Aminosäuren langes Protein und liegt auf Chromosom 5q22.2 (Friedrich und Kullmann 2003; Fearnhead et al. 2001; Nandan und Yang 2010; Muzny et al. 2012). Das APC-Protein besitzt pleiotrope Funktionen und ist unter anderem für die Regulation des Signalproteins β -Catenin verantwortlich. Die Signalübertragung, welche es den Zellen ermöglicht auf äußere Signale zu reagieren, erfolgt durch den Wnt-1-Signalweg. Bei einem Funktionsverlust von APC akkumuliert β -Catenin, welches nun von Transkriptionsfaktoren, wie den T-Zell-Faktor-DNA-bindenden Proteinen, gebunden wird. Dies führt zur Transkription einiger proliferationsfördernder Gene wie z.B. dem Protoonkogen c-myc, welches die Expression von 15% aller menschlichen Gene reguliert. Durch die so verursachte unkontrollierte Proliferation können Adenome entstehen (Friedrich und Kullmann 2003; Gearhart et al. 2007; Armaghany et al. 2012; Fearon und Wicha 2014; Irving et al. 2014).

Bei Mäusen resultiert der Verlust des APC-Gens in aberrantem Zellwachstum vieler Organe, wie Haarfollikel, Zähne oder Maul. Mäuse, bei welchen das APC-Gen in gefloxter Form vorliegt werden als $Apc^{fl/fl}$ (vgl. 2.1.7) bezeichnet. Eine Aktivierung durch Cre-Rekombinase resultiert in dem Funktionserlust des APC-Proteins (Shibata 1997; Kuraguchi et al. 2006).

2.1.2.2. V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS-Gen)

In 30-55% aller KRK finden sich Mutationen in KRAS-Gen (Kinzler und Vogelstein 1996; Johnson et al. 1997; Nandan und Yang 2010; Muzny et al. 2012) .

Ras-Gene sind Protoonkogene, Mitglieder der Guaninnucleotid-bindenden (GTP-) Proteine und damit verantwortlich für die Regulation, Proliferation und Differentiation der Zellen (Koera et al. 1997). Die Proteine der ras-Familie können vom inaktiven in einen aktiven und somit onkogenen Zustand geführt werden. Die physiologische Aktivierung erfolgt durch einen Liganden, der an EGFR (endothelial growth factor receptor) bindet, was intrazellulär zur

Aktivierung von ras führt. Die große Mehrzahl von KRAS-Mutationen finden sich an typischen Stellen, sogenannten Hotspots und betreffen vor allem Kodon 12 auf Exon 2 (z.B. KRAS G12D), seltener Kodon 13 auf Exon 2 oder Kodon 61 auf Exon 3 (Smith et al. 2010; Armaghany et al. 2012), sowie auf Kodon 19, 22, 117, 146 und 164 (Smith et al. 2010). Findet eine solche Punktmutation statt, wird die Aktivität der GTP-Proteine verringert, was in einer konstitutiven Aktivierung des ras/raf-Signalwegs und damit unreguliertem Zellwachstum resultiert (Bos 1989; Jackson 2001; Smith et al. 2010).

Die in diesem Modell verwendeten Mäuse (LSL-Kras G12D) tragen eine heterozygote, latente Punktmutation im Kodon 12, die nicht exprimiert wird, da dieser ein gefloxtes Stopkodon vorgeschaltet ist. Durch die Cre-Rekombinase wird das Stopkodon herausgeschnitten und das onkogene Protein aktiviert. Das Allel wird als LSL ("lox-Stop-lox")-K-ras G12D bezeichnet (Tuveson et al. 2004).

2.1.2.3. TP53-Tumorsuppressor-Gen

Bei 50-75% der KRK werden Mutationen in TP53 nachgewiesen (Szyllberg et al. 2015).

Erstmals beschrieben wurde dieses Gen in einer Veröffentlichung von Lane und Crawford im Jahre 1979 (Lane und Crawford 1979; Harris 1996; Freed-Pastor und Prives 2012). Es kodiert für das Protein p53 und befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 17p (Baker et al. 1989).

Auch in TP53 gibt es hotspot-Mutationen; die häufigste ist hierbei die strukturelle Mutante p53 R175H auf Codon 175 (entsprechend p53 R172H in der Maus). Sie zieht zwei Effekte nach sich. Durch den dominant-negativen Effekt auf die Wildtyp-Funktion, kann die tumorsuppressive Fähigkeit des verbleibenden Wildtyp-Allels beeinträchtigt oder sogar aufgehoben werden, in vielen Fällen kommt es auch zum vollständigen Verlust des Wildtyp-Allels („loss of heterozygosity“). Es werden folglich keine DNA-Schäden repariert, bzw, falls nötig wird keine Apoptose eingeleitet (Harris 1996; Levine 1997; Jackson 2005; Liu et al. 2013). Zudem bewirkt die Punktmutation, bei der es zu einem Austausch der Aminosäuren Arginin durch Histidin kommt, eine „gain-of-function“. Dies bedeutet, dass zusätzlich, unabhängig vom Wildtyp, onkogene Eigenschaften durch die Mutation entstehen; aus dem Tumorsuppressorgen TP53 wird also ein Protoonkogen (Baker et al. 1989; Olive et al. 2004; Jackson 2005; Doyle et al. 2010; Liu et al. 2013). Zu diesen onkogenen Eigenschaften zählen Zellproliferation, Angiogenese, Migration, Invasion, die Bildung von Metastasen sowie

Chemoresistenz (Freed-Pastor und Prives 2012). Diese Effekte betreffen nicht nur Mutationen in Kodon 175 sondern auch in anderen Kodons, wie 158, 245, 248, 249 und 273 (Baker et al. 1989; Jackson 2005; Doyle et al. 2010)

Bei normalem Zellwachstum ist p53 auf Grund verschiedener negativer Regulatoren nur gering exprimiert (Liu et al. 2013).

Die im hier beschriebenen Versuch verwendeten Mäuse tragen eine konditionelle Mutation im Kodon 172 von Tp53 (entspricht dem humanen Kodon 175), dem mutierten Gen wurde vor Exon 1 ein gefloxtes Stop-Kodon vorgeschaltet. Cre-Rekombination aktiviert das mutierte Tp53 (Jonkers et al. 2001; Olive et al. 2004).

2.2. Mausmodelle

Mausmodelle sind eine gut geeignete und oft eingesetzte Methode in der Krebsforschung. Diese Modelle weisen im Vergleich zu anderen Tiermodellen einige Vorteile auf. Dazu zählen günstige Unterhaltskosten und kurze Zuchtperioden. Außerdem besitzt das menschliche Genom viele Übereinstimmungen mit dem der Maus (Mouse Genome Sequencing Consortium et al. 2002) und man kann vergleichsweise einfach Genmanipulationen vornehmen (Nandan und Yang 2010; Roper und Hung 2012).

Es gibt Mausmodelle, die auf dem Verfahren der Xenotransplantationen basieren. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass sich durch die in-vitro Fortpflanzung der Zellen und die spätere subkutane Übertragung in die jeweilige Spezies die Ergebnisse teilweise nicht durch klinische Studien an Menschen bestätigen lassen (Roper und Hung 2012). Es ist zwar möglich menschliche Tumorfragmente direkt in immundefiziente Mäuse zu verpflanzen, um so eine genetische und histologische Übereinstimmung zu erreichen, diese Modelle sind allerdings sehr zeitintensiv und benötigen eine hohe Patientenzahlen (Dangles-Marie et al. 2007).

2.3. Genetisch induzierte Mausmodelle (GEMM)

Als Alternative zu den herkömmlichen Mausmodellen wurden genetisch induzierte Mausmodelle (GEMM) entwickelt, in denen die Treibermutationen der humanen Erkrankung gewebespezifisch in der Maus aktiviert werden, um so die Krankheit zu simulieren. Es gibt einige Bedingungen, die ein solches GEMM des KRK erfüllen muss. Zunächst einmal soll der Tumor eine möglichst kurze Latenzzeit aufzeigen und dabei eine hohe Penetranz aufweisen, um die Tumorentwicklung bei einer hohen Anzahl von Mäusen in einer relativ kurzen Zeitspanne zu erreichen (Roper und Hung 2012). Außerdem sollen die Tiere einen Tumor im Kolonepithel entwickeln, der von somatischer Modifikation solcher Gene stammt, die auch beim humanen KRK beteiligt sind. Die Tumorentwicklung erstreckt sich idealerweise über die komplette Bandbreite vom Adenom über das Karzinom bis hin zur Metastasierung (Hung et al. 2010). So ist es möglich, mehr über die Mechanismen der Tumorentwicklung, sowie der Metastasierung herauszufinden um verschiedene Therapien zu testen (Singh et al. 2012).

2.4. Anwendung für diese Arbeit

Ein solches Modell wurde bereits beschrieben (Hung et al. 2010), in diesem Modell wurden jedoch lediglich Apc und Kras modifiziert, was zu nicht-metastasierenden Tumoren geführt hat. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Weiterentwicklung des von Hung et al. entwickelten Modells durch die Einführung einer weiteren Mutation im Tp53-Gen und die Charakterisierung der resultierenden Tumorerkrankung.

2.5. Cre/lox P System

Das Cre/loxP-System wurde in den 1980er Jahren entwickelt (Sternberg et al. 1981; Sauer und Henderson 1988). Es besteht zum einen aus einem 38kD-Protein, das zu der Klasse der Rekombinasen der Familie der Integrasen gehört und dem Bakteriophagen P1 entstammt. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich genetische Modifikationen durchzuführen (Sauer und Henderson 1988; Nagy et al. 2000).

Um gezielt eine DNA-Sequenz zu manipulieren muss vor und nach der gewünschten DNA-Sequenz je ein loxP-Baustein, bestehend aus 34 Basenpaaren, angefügt werden. Dieser Vorgang wird als floxen („flanked by loxP“) bezeichnet (Sternberg et al. 1981). Der gefloxt DNA-Abschnitt wird von der Cre-Rekombinase erkannt und herausgeschnitten. Je nach Orientierung der loxP-Bausteine unterscheidet sich das Herausschneiden der gewünschten Sequenz durch die Rekombinase: In gleicher Richtung angeordnet findet eine Exzision statt und der gefloxt Genabschnitt wird so deletiert. Bei entgegengesetzter Anordnung kommt es zu einer Inversion der DNA-Sequenz. Sind die loxP-Bausteine zwar in gleicher Richtung, aber an unterschiedlichen DNA-Strängen angeordnet, findet eine Translokation der Sequenzen statt (Metzger und Feil 1999; Nagy et al. 2000), (Abbildung 2).

Anwendung findet dieses System *in vitro* und *in vivo* in Hefezellen, Pflanzen- und Säugerzellen (Sauer und Henderson 1988; Anton und Graham 1995; Araki et al. 1997).

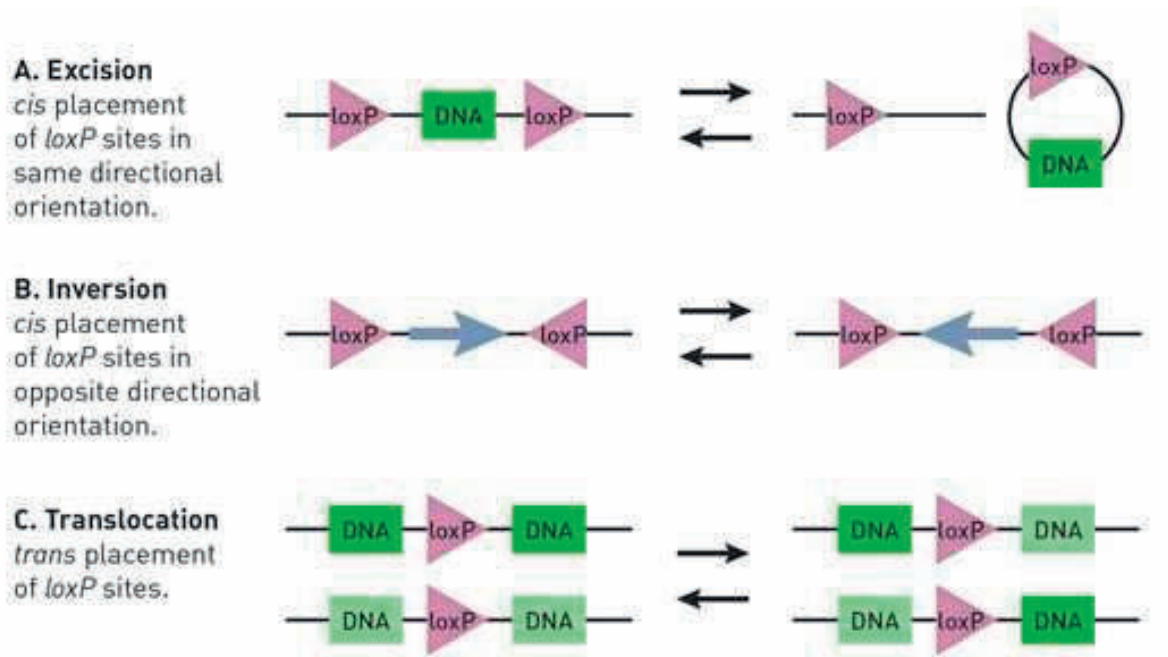


Abbildung 2 Das Cre/loxP-System

A Exzision: DNA-Sequenz wird durch loxP in gleicher Richtung flankiert und dann herausgeschnitten und wieder ringförmig zusammengefügt

B Inversion: die loxP-Sequenzen sind in entgegengesetzter Richtung angeordnet und die DNA-Sequenz wird in umgekehrter Reihenfolge wieder zusammengefügt

C Translokation: hier sind die loxP-Bausteine zwar in gleicher Richtung, aber an unterschiedlichen DNA-Strängen angeordnet die DNA-Sequenz wird zwischen zwei Strängen ausgetauscht; modifiziert nach JAX Notes (JAX Notes, 2006 <https://www.jax.org/news-and-insights/2006/may/the-cre-lox-and-flp-frt-systems>)

2.6. Adenovirus

Um DNA-Abschnitte gezielt durch die Rekombinase herauszuschneiden, muss Cre im Nukleus vorhanden sein (Sauer und Henderson 1988; Sauer und Henderson 1989; Anton und Graham 1995). Dafür werden im hier beschriebenen Modell Adenoviren verwendet, welche für Cre-Rekombinase kodieren (Hardy et al. 1997). In klinischen Studien sind Adenoviren die *in vivo* am häufigsten verwendeten Vektoren, weil die Generierung des Virus relativ einfach durchzuführen ist. Die Infektionseffizienz ist hoch, da sie eine Vielzahl von Zelltypen und Zellen, ruhende und sich teildende, infizieren können (Hardy et al. 1997; Anderson et al. 2000; Kay et al. 2011).

Erstmals beschrieben und in Zellkultur vermehrt wurden Adenoviren im Jahr 1953 (Rowe et al. 1953). Es sind unbehüllte Viren, deren Genom aus linearer doppelsträngiger DNA mit 36 000 Basenpaaren zusammengesetzt ist. Sie besitzen ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 90 nm und einer Molekülmasse von 150 MDa. Die Kapside bestehen aus 240 Hexonen und 12 Pentonen. Die Replikation sowie die Transkription und die Virusreifung finden im Zellkern statt (Reddy et al. 2010; Liu et al. 2010; Nemerow et al. 2012; Snijder et al. 2013).

2.7. Onkologie Veterinärmedizin

Haustiere nehmen beim Menschen einen immer höheren Stellenwert ein. Durch die verbesserte Pflege und medizinische Versorgung werden die Tiere immer älter. Besitzer sind bereit sehr viel zu investieren, um eine möglichst lange Zeit mit ihnen verbringen zu können.

Jedoch stirbt statistisch gesehen jeder vierte Hund über zwei Jahren an einer Tumorerkrankung. Auch hier wird eine dem Menschen vergleichbare medizinische Versorgung, wie Chirurgie, Strahlentherapie, Immuntherapie oder Chemotherapie, gefordert (Paoloni und Khanna 2007).

Neoplasien des Kolons sind bei Haustieren relativ selten. Tumoröse Entartungen des Kolons kommen vor allem bei Hunden und Katzen mittleren Alters vor. Hunde, welche intestinale Adenokarzinome entwickeln (zumeist im Rektum) haben ein durchschnittliches Alter unter 10 Jahren (Patnaik et al. 1977). Bei Katzen beträgt das Durchschnittsalter bei Erkrankung an malignen Neoplasien des Dickdarms, davon 46% Adenokarzinome, 12,5 Jahre (Slawinski et al. 1997).

Verglichen mit der Humanmedizin gibt es einige Überschneidungen bei der Tumorentstehung, den histologischen und genetischen Eigenschaften, dem weiteren Verlauf sowie dem Ansprechen auf verschiedene Therapien (Paoloni und Khanna 2008; Tang et al. 2010). Eine wesentliche Rolle bei der Tumorentstehung spielen in beiden Bereichen unter anderem das Alter, die Ernährung, das Geschlecht, sowie Umwelteinflüsse (Hayes und Fraumeni 1977; Bukowski et al. 1998; Paoloni und Khanna 2008). Die genetischen Veränderungen sind beim Hund meist dieselben wie sie beim Menschen vorkommen (Paoloni und Khanna 2008; Tang et al. 2010). Der Anteil der Veränderungen der Genome beträgt laut einer Studie an 10 Hunden mit kolorektalem Karzinom 5% - 22% (Tang et al. 2010). Wie auch in der Humanmedizin ist eine Mutation im APC-Gen eines der ersten Ereignisse und die häufigste Ursache für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms. APC kommt vor allem in intestinalen Epithelzellen am Ende der Krypten oder auf der luminalen Oberfläche des Kolons vor und regeln dort das Zellwachstum (McEntee und Brennenman 1999). Eine Mutation des Genes hat eine Anhäufung von β -Catenin zur Folge, was wiederum zu unkontrollierter Proliferation der Zellen führt und es zur Entstehung eines intestinalen Adenoms kommt (McEntee und Brennenman 1999; Youmans et al. 2012). In 50% aller kolorektalen Tumoren sowohl beim Menschen als auch beim Hund wird eine Mutation in p53 gefunden. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose (Gamblin et al. 1997; Wolf et al. 1997).

Beim Hund sind 3% aller Tumoren intestinalen Ursprungs, davon treten wiederum 60% im Kolon auf (Morello et al. 2008). Seltener betroffen sind das Zäkum und Ileum (Patnaik et al. 1977). Eine Studie an 22 Katzen kommt zu dem Ergebnis, dass bei Katzen die größte Anzahl der Adenokarzinome im Dünndarmbereich liegt (Patnaik et al. 1976). Das Durchschnittsalter beim Entdecken solcher Erkrankungen liegt bei 7 Jahren und die Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt durchschnittlich 20 Monate (Holt und Lucke 1985; Church et al. 1987; Wolf et al. 1997). Rüden zeigen ein höheres Risiko (65%) an einem intestinalen Adenokarzinom zu erkranken, wobei Hündinnen öfter (58%) Leimyosarkome des Intestinums entwickeln. Dies stimmt mit Forschungsergebnisse beim Menschen überein: Männer erkranken ebenfalls öfter an einem intestinalen Adenokarzinom (Jemal et al. 2011). Ähnliche Ergebnisse bei Katzen zeigt eine Studie, welche bei männlichen Tieren doppelt so oft Adenokarzinome dokumentiert (Patnaik et al. 1976). Betrachtet man die totale Anzahl der Tumorerkrankungen des Intestinums, so ist das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Tieren gleich. Bei großen Hunderassen wie dem Collie oder dem Deutschen Schäferhund wird eine signifikant höhere Anzahl intestinaler Adenokarzinome festgestellt. (Patnaik et al. 1977). Der Boxer ist die Hunderasse mit der häufigsten Anzahl an Tumoren allgemein und auch im Speziellen im Gastrointestinaltrakt (Patnaik et al. 1976). Die Siamkatze erkrankt dreimal so häufig an Adenokarzinomen verglichen mit der Europäischen Kurzhaarkatze. (Patnaik et al. 1976).

In der veterinärmedizinischen Literatur gibt es verschiedene Fallzahlen zur Histologie der Tumoren. In einer Studie von Wolf und Mitarbeitern an 80 Hunden mit einem kolorektalen Tumor ergibt die histologische Auswertung, dass bei 44 % das Tumor-Suppressor-Gen p53 beteiligt ist. Wobei 43% als benigne und 57% als maligne klassifiziert werden (Wolf et al. 1997). Dies spiegelt sich in den Ergebnissen aus der Literatur anderer Autoren wider, die ebenfalls die Mehrzahl (60%) der kolorektalen Tumoren als maligne beschreiben (Patnaik et al. 1977; Holt und Lucke 1985; Church et al. 1987; Valerius et al. 1997; Morello et al. 2008).

Bei der Metastasierungsrate gibt es unterschiedliche Angaben in der Literatur. Diese reichen von 0- 80% (Patnaik et al. 1976; Holt und Lucke 1985; Church et al. 1987; Morello et al. 2008). Die klinischen Symptome sind unterschiedlich und beinhalten sowohl bei Katzen als auch bei Hunden Gewichtsverlust, Anorexie, Diarrhoe, Vomit, Melena, Tenesmus und Hämatochezie (Patnaik et al. 1976; Holt und Lucke 1985; Church et al. 1987; Paoloni et al. 2002). Eine Vielzahl von Methoden stehen zur Diagnosestellung zur Verfügung. Dazu zählen zunächst nach einer gründlichen allgemeinen Untersuchung mit Blutbild, die rektale und abdominale Palpation, Kotuntersuchung, Abdomen-Röntgen, abdominaler Ultraschall, sowie die Endoskopie mit Biopsienahme für die histopathologische Untersuchung (Slawiński et al. 1997; Paoloni et al. 2002; Paoloni und Khanna 2008). Mittlerweile werden in der

Veterinärmedizin immer häufiger weiterführende Verfahren wie Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eingesetzt (Lawrence et al. 2010).

Bei einer Neoplasie ist die erste Therapie der Wahl stets die chirurgische Resektion. Die Überlebenszeit nach einem solchen Eingriff beträgt im Durchschnitt 22 Monate (Church et al. 1987). Ob es zu einem chirurgischen Eingriff kommt, muss vom Allgemeinbefinden, Alter des Tieres, Intensität des Tumors und eventueller Metastasenbildung abhängig gemacht werden. Bei infauster Prognose wird eine schmerzlose Euthanasie vorgeschlagen.

Die Rezidivrate ist bei Karzinomen wesentlich höher (55%) als bei adenomatösen Polypen (17%) (Valerius et al. 1997). Eine Studie an 11 Hunden mit Adenokarzinomen zeigte eine Rezidivrate von 18,2 % (Morello et al. 2008).

2.8. Ziel der Dissertation

Die meisten Mausmodelle des KRK basieren auf der subkutanen oder orthotopen Injektion von Zelllinien in immundefizienten Mäusen. Nachteilig bei diesen Modellen ist der artifizielle Charakter und die schlechte Metastasierungsrate.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein GEMM (Hung et al. 2010) weiter zu entwickeln um metastasierende Tumoren zu erzeugen. Um die Übertragbarkeit auf den Menschen zu erreichen, werden anders als beim klassischen Tumorzell-Injektionsverfahren, genetische Manipulationen der Versuchstiere vorgenommen. Die Adenom-Karzinom-Sequenz soll durch die Kreuzung von Mäusen mit konditionellen Kras- und p53-Mutationen und solchen mit konditionellem Knockout des Apc-Gens rekapituliert werden. Für dieses GEMM ist das Cre/loxP-System ideal geeignet, da die Expression onkogener Gene reguliert werden kann (Anton und Graham 1995). Durch die konditionelle Inaktivierung der Gene wird die embryonale Letalität der Tiere stark herabgesetzt (Evans et al. 2015).

Die so erzeugten Tumoren sollen im klinischen Verlauf, dem Metastasierungsmuster und der Histologie charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Mäusstämme

Für die Versuche kamen folgende Stämme transgener Mäuse (*Mus musculus*) zum Einsatz:

B6.Cg.Apc^{tm2Rak}/Nci (Kuraguchi et al. 2006)

B6.129-Kras^{tm4Tyi}/Nci (Jackson 2001; Johnson et al. 2001)

129S4-Trp53^{tm2Tyi}/Nci (Olive et al. 2004)

FVB.129-Trp53^{tm1Bm}/Nci (Marino et al. 2000; Jonkers et al. 2001)

Die Tiere wurden vom NCI Mouse Repository in Frederick, MD, USA bezogen.

Die Mäuse der Stämme p53^{LSL-R172H} and p53^{floxed} wurden für mindestens 10 Generationen auf C57Bl/6N-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) zurückgekreuzt um einen C57Bl/6N Hintergrund für die p53- Allele zu erhalten. Alle Mäuse in der vorliegenden Arbeit sind somit genetisch reine C57Bl/6N-Mäuse.

Die Tierversuche wurden alle nach Richtlinien der FELASA durchgeführt und zuvor von verschiedenen Ethikkommissionen geprüft und genehmigt (Aktenzeichen: 35-9185.81/G-188/11). Die Zucht und Aufzucht der Mäuse fand in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg statt. Dort wurden die Tiere unter standardisierten Umweltbedingungen pathogenfrei gehalten. Die maximale Gruppengröße pro Käfig betrug vier Tiere. Die Fütterung geschah *ad libitum* mit pelletiertem Haltungsfutter und die Tiere hatten freien Zugang zu frischem Trinkwasser bei einem 12 Stunden Tag-/Nacht-Rhythmus.

Zu Beginn der Versuche hatten die Mäuse ein Alter von mindestens fünf Wochen und wogen zwischen 16 g und 24 g.

Insgesamt wurden 299 Mäuse mit unterschiedlichen Genotypen für die Versuche verwendet. In jeder Mauslinie waren Kontrollgruppen integriert. Diese bestanden zum einen aus Wildtypen zum anderen wurde kein Adenovirus sondern eine 0,9%ige Natriumchloridlösung injiziert.

Folgende kombinierten Genotypen wurden verwendet:

- i. $Apc^{fl/fl}$ („Apc“)
- ii. $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+}$ („AK“)
- iii. $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl}$ („AKPfl“)
- iv. $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+}$ („AKPr“)

3.2. Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurde ein kleines Endstück des Mausschwanzes abgetrennt. Zu dem Gewebe wurde 600 µl Proteinase-K-Puffer und 30 µl Proteinase-K (10mg/ml) gegeben, gevortext und im Thermomixer bei 56 °C und 900 rpm so lange belassen, bis das Gewebe verdaut war. Dann wurde 300µl 5 M NaCl hinzugefügt, gemischt und für 30 Minuten bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neue 1,5 ml – Eppendorf-Tube gegeben und mit 500 µl Isopropanol durchmischt, bevor für 20 Minuten bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und die Eppendorf-Tube kurz abgetropft bevor 300 µl Ethanol (70%) dazugeben und vermischt wurde. Danach wurde erneut zentrifugiert für 10 Minuten bei 4 °C und 13 000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und die Eppendorf-Tube mehrere Stunden über Kopf getrocknet. Anschließend wurde zu der nun isolierten DNA 30 µl H₂O hinzugefügt, gemischt und für 1 Minute bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

Die folgenden Primer-Sequenzen (5' zu 3') wurden verwendet:

Primer für APC:

T035: CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG

T036: AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A

T036: TTA CAC ATC CAG CCT CTG TGG

ApcF2: GAG AAA CCC TGT CTC GAA AAA A

ApcR2: AGT GCT GTT TCT ATG AGT CAA C

Primer für LSL-KrasG12D:

K004: GTC GAC AAG CTC ATG CGG GTG

K005: AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A

K006: CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA

Primer für p53:

T008: CAC AAA AAC AGG TTA AAC CCA G

T009: AGC ACA TAG GAG GCA GAG AC

Um die Lösung für die Primer herzustellen musste zunächst die nmol-Angabe des Primers von Invitrogen in µl umgerechnet werden:

nmol-Angabe x 10= Menge an H₂O mit welcher der Primer gelöst wird

Die Primer-Verdünnung (1:10) wurde mit H₂O hergestellt und dazu gegeben.

Zu je 1 µl DNA wurde 24 µl Mix gegeben, welcher sich wie folgt zusammensetzte:

2,5 µl 10*ReaS

0,5 µl dNTP

1,5 µl Primer

0,1 µl Taq

19,4 µl H₂O

Zusätzlich wurde Mix für Positivkontrollen und eine Negativkontrolle (= Mix ohne DNA) hergestellt.

Es wurden 0,2-Stripes mit je 1 µl DNA und 24 µl Mix befüllt, welche dann in das Thermocycler System gegeben wurden.

Programm:

Temperatur (°C)	Zeit t (Minuten)	Label
94	3:00	
94	0:30	
60	0:30	35 Zyklen
72	0:30	
72	3:00	
4	Hold	

Es wurde ein 1,7 % Agarose-Gel aus 2,5 g Agarose HR-Plus-Pulver +150 ml TBE hergestellt. Zum Einfärben der Nukleinsäuren wurde 4 µl des Fluoreszenzfarbstoffes GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain hinzugefügt. Das flüssige Gel wurde dann zum Erkalten in die mit 16er-Kämmen vorbereitete Gelkammer gegossen.

In jedes DNA-Stripe wurde 5 µl DNA Loading Dye pipettiert. Im nun fest gewordenen Gel wurde jeweils in das erste und letzte Kästchen einer Reihe 5 µl des Markers O`GeneRuler 1kb DNA Ladder gegeben. Die restlichen Kästchen wurden mit je 15 µl der DNA beladen und die Elektrophorese bei 100 Volt laufen gelassen.

Nachdem das Gel aus der Kammer gelöst wurde, konnten die Ergebnisse unter UV-Licht im UVP-Bio Doc It™-System sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

3.3. Viruspropagation Ad5CMVCre

Das Cre-kodierende Adenovirus AdCre1 ist bereits vorbeschrieben (Anton and Graham 1995). Das verwendete Virus stammt vom Gene Transfer Vector Core (University of Iowa, Iowa , USA).

Artikel	Einheit
Ad5CMVCre	1ml
Erstellungsdatum: 10.28.2011	
Titer: 5×10^{10} pfu/ml	
Erstellungsdatum: 8.10.2010	

Die Viruspropagation wurde in der Virologie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg durchgeführt.

Der Virustiter betrug 5×10^{10} pfu/ml. Die Viruspropagation wurde in 293Q (HEK293) Zellen durchgeführt. Es wurde ein 2%Medium angefertigt, welches sich aus DMEM (Glutamax)+ 2% FCS+ 1% Pen/Strep zusammensetzte, sowie ein 10%Medium, welches aus DMEM (Glutamax)+ 10% FCS+ 1% Pen/Strep bestand. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen ausplattiert. Die Infektion der Zellen mit dem o.g Virus erfolgt bei einer Konfluenz von 70-90%. Die Infektion je 150cm^3 erfolgte in 10 ml 2%Medium mit 2 μl der Virussuspension. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ wurden dem Infektionsansatz 10 ml 10% Medium hinzu gegeben und täglich überprüft, ob die Zelllyse eingetreten war. Bei einer Zelllyse von ca. 80% wurden die Zellen durch Resuspendieren mit dem Überstand vollständig von der Oberfläche gelöst und in ein 50-ml-Falkon überführt. Anschließend folgte die Zentrifugation der Zellsuspension für 15 Minuten bei 1500 rpm. Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 5 ml entfernt, womit die Resuspension der Zellpellets aller Falkons durchgeführt wurde. Die gesamte Zellsuspension wurde dreimal bei -80 °C eingefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut, um den Virus aus den Zellen zu lösen. Danach wurde die Suspension für 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der nun den Virus enthaltene Überstand wurde in 1,5 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Nun erfolgte die Infektion von 20 Zellkulturschalen (150cm^3) mit dem Virusüberstand aus den oben beschriebenen 5 Zellkulturschalen (150cm^3). Hier wurde 2 ml des Virusüberstands in 10 ml 2% Medium gegeben, vermischt und 10 ml auf jede Platte verteilt. Bei einer Zelllyse von ca. 80% konnte das Virus aus den 25 Zellkulturschalen (150 cm^3) geerntet werden. Hierfür wurden die Zellen abgespült und in 50 ml Flakons überführt, danach austariert und 10 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Es erfolgte die Abnahme des Mediums bis auf einen Rest von 5 ml, womit alle Pallets resuspendiert wurden. Die Lagerung fand bei -80°C statt.

Nachdem der Virus dreimal bei 37°C aufgetaut und wieder bei -80°C eingefroren wurde, was ein Lösen des Virus aus den aufgeplatzten Zellen bewirkt, wurde für 15 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, damit sich die Zelltrümmer vom Virus trennen. Der Überstand wurde nun gleichmäßig auf zwei CsCl-Dichtegradienten verteilt und austariert. Für den Gradienten wurde 3ml CsCl unten und 5 ml CsCl oben geschichtet. Die nach dem Zentrifugieren in der Ultrazentrifuge für 4h Stunden bei 32000U und 4°C erkennbare Virusbande konnte nun mit Hilfe einer Kanüle geerntet werden. Wenn zwei Banden sichtbar waren, wurde die obere Bande geerntet. Das so gewonnene Virus wurde mit 5 mM PBS auf 7 ml aufgefüllt. Nachdem der Virus gleichmäßig auf die beiden neuen Gradienten geschichtet und austariert wurde, erfolgte erneutes Zentrifugieren für 18 Stunden bei 32000 U und 4°C .

Die untere Bande wurde mit Hilfe einer Kanüle aus dem Dichtegradienten isoliert und in einem TCID50 Röhrchen aufgefangen und auf Eis zwischengelagert. Die Aufreinigung des Virus erfolgt über eine PD 10 Aufreinigungssäule. Die PD 10 Säule wurde vorequibriert. Nach dem Vorequilibrieren wurde der Virus auf ein Gesamtvolumen von 2,5 ml PBS aufgefüllt. Der vollständige Virusansatz wurde auf die PD 10 Säule gegeben und einlaufen gelassen. Im Anschluss wurden 0,5 ml PBS auf die Säule gegeben und verworfen. Nun wurde der Virus mit 2 ml PBS von der Säule gelöst. Der Durchfluss mit dem aufgereinigten Virus wurde aufgefangen. Nach Zugabe von 10% Glycin wurde das Virus in 50 μl Aliquots aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.4. TCID 50

Die Viruskonzentration wurde über die “tissue culture infectious dose of 50%“ (TCID₅₀) bestimmt. Dieser Vorgang fand im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg statt.

10000 Zellen wurden in 100µl 2%Medium pro Lochplatte über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnte der Virus hinauf pipettiert werden.

Die standardmäßige Verdünnung auf den Platten betrug 1:100000 bis 1: 1Billion (10^{-5} bis 10^{-12}): Die Verdünnungen wurden folgendermaßen hergestellt:

Die erste Verdünnung war 1:100 (10^{-2}): 990µl 2% Medium + 10 µl Virusstock

Die zweite Verdünnung war 1:10000 (10^{-4}): 990µl 2% Medium + 10µl aus der ersten Verdünnung

Die dritte Verdünnung war 1:100000 (10^{-5}): 1,5ml 2% Medium + 166µl aus der zweiten Verdünnung.

Die vierte Verdünnung war 1:1000000 (10^{-6}): 1,5ml 2% Medium + 166µl aus der dritten Verdünnung. Nach diesem Schema wurden die Verdünnungen bis 1:1Billion (10^{-12}) erstellt.

Danach wurden jeweils 100µl der Verdünnungen pro well auftragen.

Zu jeder Verdünnung wurden je zwei Negativkontrollen angefertigt. Hierzu wurde je 100 µl des 2%Medium ohne Viruszugabe verwendet.

Nach 12 Tage Inkubation konnten die Lochplatten, welche Lyse zeigten, mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgelesen und die TCID₅₀/ml mit der folgenden Formel bestimmt werden:

$$\text{titer [TCID}_{50}=\text{mL}] = 10_{d+(0:1_n\text{pos})+1:5}$$

Der im folgenden verwendete Virus wies eine Konzentration von 10^{11} pfu/ml auf.

3.5. Infektion des Kolons mit Adeno-Cre

Durch die Infektion des Kolons mit dem Cre-Adenovirus ist es möglich, gezielt die in gefloxter Form vorliegenden Genmutationen in den Mäusen zu aktivieren. Für diese Infektion wurde das Protokoll von Hung modifiziert (Hung et al. 2010). Im Gegensatz zu Hung, welcher Mutationen im Apc- und Kras-Gen beschreibt, wurden in unserem Mausmodell Mäuse gezüchtet, bei denen ein weiteres konditionales Allel von Tp53 eingekreuzt worden ist. Außerdem kann auf das Ausnüchtern der Mäuse über Nacht verzichtet werden, da das Kolon mit NaCl vorgereinigt wird, um Stress für die Tiere zu vermeiden. Wegen der höheren Viruskonzentration konnte auf das Abbürsten der oberen Schicht der Darmzotten verzichtet werden, was mit einem geringeren Risiko für Darmperforationen und postoperativer Mortalität einhergeht.

Im Folgenden wird die Operationsmethode für diese Arbeit beschrieben. Die Infektion des Kolons mit Adeno-Cre wurde frühestens mit einem Alter von fünf Wochen durchgeführt. Zum Erreichen des Narkosestadiums kamen die Tiere in Narkoseboxen, die zunächst mit 4-5 % Isofluran geflutet wurden. Sobald die Maus in Narkose lag, wurde sie auf die Wärmeplatte (37,5°C) umgelagert und in Rückenlage fixiert, wobei die Narkose durch Inhalation mit O₂ bei einer Konzentration von 2,5-3 % Isofluran erhalten blieb. Zum Schutz der Kornea wurde diese mit Augensalbe versehen.

Um intra- und postoperative Schmerzen zu vermeiden, wurden die Tiere mit 0,05 mg/kg Buprenorphin s.c. behandelt. Das Abdomen wurde rasiert und desinfiziert. Sobald die Vollnarkose durch negativen Zwischenzehenreflex bestätigt wurde, konnte das Abdomen mittels medianer Unterbauchlaparotomie eröffnet werden. Das distale Kolon wurde ca. 1-2 cm proximal der Linea dentata mittels einer Yasargil-Gefäßklemme abgeklemmt und nun ein flexibler Teflonschlauch transanal bis zur Klemme eingeführt. Um Kotreste zu entfernen wurde der Enddarm zunächst mit 0,9% NaCl-Lösung gespült. 5 mm distal der ersten Klemme wurde nun eine zweite weiche Klemme am Kolon fixiert, so dass der Schlauch zwischen beiden Klemmen zu liegen kam. Um die Kolonmukosa aufzubrechen wurde nun 50-80 µl Trypsin-EDTA 0,25% durch den Schlauch instilliert. Nach 10 Minuten wurde die distale Darmklemme entfernt, das Trypsin aspiriert und anschließend erneut mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült. Nun konnte die Eppendorf-Tube mit 50 µl Adenovirus-Suspension (1×10^{11} pfu/ml) aufgetaut werden und mit Hilfe einer dünnen Kanüle samt 1ml-Spritze aufgezogen und an den Teflonschlauch anbracht werden. Der Teflonschlauch wurde wiederum in das Kolon bis zur Klemme transanal eingeführt und distal durch eine zweite Klemme abgedichtet, so dass die Installation der 50 µl Adenovirus-Suspension erfolgen

konnte. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde das offene Abdomen regelmäßig mit 0,9% NaCl-Lösung befeuchtet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten konnte alles entfernt werden und die Muskel- und Faszien-schicht fortlaufend mit PDS II 5-0 genäht werden. Der Haut wurde mit chirurgischen Hautklammern verschlossen.

Das Allgemeinbefinden der Mäuse wurde täglich überprüft und sobald sich dieses stark verschlechterte was sich unter anderem durch Apathie, glanzloses Fell oder gekrümmte Haltung zeigte wurden sie mittels zervikaler Dislokation getötet. War dies nicht der Fall, konnten nach 10 Tagen die Hautklammern entfernt werden.

3.6. Koloskopie

Eine Woche postoperativ wurden die ersten Koloskopien durchgeführt. Diese wiederholten sich bis zur Tumordiagnose zweimal wöchentlich. Auf vorherigen Futterentzug konnte verzichtet werden, da sich eventuell vorhandene Kotreste im Rektum ohne Schwierigkeiten mit dem Koloskop hinter den Tumor schieben ließen.

Zunächst wurden die Mäuse in eine Narkosebox gesetzt, welche langsam mit 4-5% Isofluran geflutet wurde. Sobald das Narkosestadium eintrat, welches durch den negativen Zwischenzehenreflex überprüft wurde, konnten die Tiere vorsichtig in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (37,5°C) fixiert werden. Zum Schutz der Kornea wurde eine Augensalbe aufgetragen. Die Aufrechterhaltung der Narkose fand mittels Inhalation mit O₂ bei einer Konzentration von 2,5-3 % Isofluran statt. Um das Kolon etwas zu dehnen wurde beim Einführen vorsichtig Luft insuffliert.

3.7. Statistik

Die statistische Auswertung wurde für kategorische Daten mittels χ^2 Test und die Überlebensdaten mittels Log-rank Test (Darstellung nach Kaplan-Meier) durchgeführt. Für Mehrfachvergleiche wurden ANOVA mit Turkey-Post-Test verwendet. $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und falls angebracht für multiples Testen adjustiert. Für die statistische Analyse und die Datenerfassung wurde Graphpad Prism 7 (Graphpad Software Inc.) genutzt. Statistisch signifikante Werte werden mit Sternchen angezeigt (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

3.8. Probengewinnung und Aufbereitung

Die Tiere wurden zu vordefinierten Zeiten (Tage=d) (56d, 112d, 168d) schmerzfrei durch zervikale Dislokation getötet. Zusätzlich zu diesen festgesetzten Zeitpunkten wurden Überlebensgruppen angelegt. Diese Tiere wurden erst getötet, wenn sie schlechtes Allgemeinbefinden zeigten.

Gewebeproben wurden vom Tumor, Leber und Lunge entnommen und für die weitere Bearbeitung für die histologische Bestimmung in 4%igen Formalin (Paraformaldehyd) konserviert. Zusätzlich wurde Tumorgewebe und Gewebe eines gesunden, mit 0.9% NaCl gereinigten Darmabschnittes gewonnen und in Kryokonservierung bei -80°C aufbewahrt.

Die Herstellung der histologischen Schnitte und deren Hämatoxylin-Eosin-Färbung führte das Pathologische Institut der Universitätsklinik Heidelberg durch.

Die histologische Bewertung und Einstufung wurde durch PD Dr. Michael Muders im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Carl Gustav der TU Dresden vorgenommen. Die Einteilung der malignen Tumoren fand gemäß der TMN-Klassifikation statt.

4. Ergebnisse

Die operative Tumorinduktion konnte bei 287 Tieren durchgeführt werden. Als Kontrolltiere dienten davon je 2 Tiere aus jeder der vier Genotypgruppen (n=8). Diese wurden nicht mit Adenovirus, sondern mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung infiziert. Zusätzlich zu diesen Tieren wurden zur Kontrolle 12 Wildtypmäuse in die Versuche eingebracht, welche die gleiche Behandlung wie die genmanipulierten Mäuse erhielten. Keines der Kontrolltiere entwickelte Tumoren.

Von den 279 Mäusen (ohne Kontrolltiere) mussten 31 postoperativ getötet werden, da sie stark vermindertes Allgemeinbefinden zeigten.

Die restlichen Mäuse (n=248) wurden zweimal pro Woche unter Inhalationsnarkose mittels Isofluran koloskopiert, um Tumorwachstum zu überprüfen (Abbildung 3). Von diesen Mäusen entwickelten 207 (83 %) der Tiere kolorektale Tumoren. Um das Tumorwachstum zu analysieren wurden diese nach den vier Genotypen in Gruppen unterteilt und zu drei verschiedenen Zeitpunkten (56d, 112d, 168d) schmerzfrei getötet. Aus tierschutzrelevanten Gründen konnten nicht alle Tiere bis zum Ende in dem Versuch bleiben, so dass zu jedem der drei Zeitpunkte 5-8 Mäuse pro Genotyp ausgewertet wurden (n=74). Zusätzlich wurde eine Gruppe angelegt, welche die Auswirkung der verschiedenen Mutationen auf das Überleben zeigen sollte. Hierfür wurden insgesamt 60 Mäuse, von jedem Genotyp 15 Tiere, untersucht. Sobald die Tiere schlechtes Allgemeinbefinden zeigten, wurden sie durch zervikale Dislokation getötet.

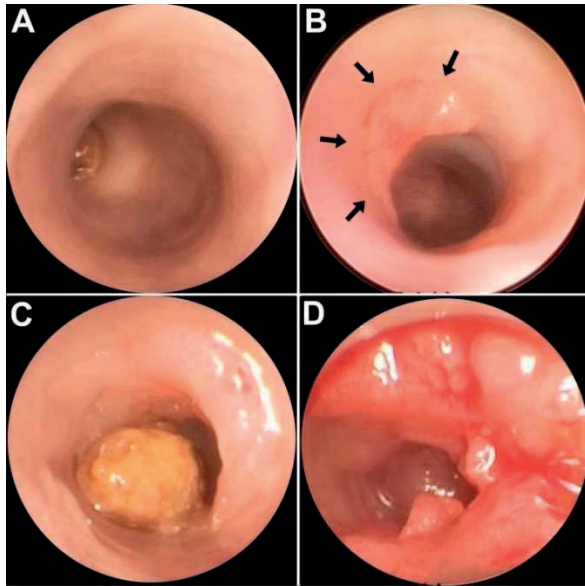


Abbildung 3 Koloskopie

A normales Kolon. **B** Frühes Adenom (Pfeile) in einer Apc-Maus. **C** Spätes Adenom/ frühes Karzinom in einer AK-Maus. **D** Fortgeschrittenes Adenokarzinom in einer AKPr-Maus.

Apc, Apc^{fl/fl} Maus; AK, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} Maus; AKPr, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+} Maus.

Im Folgenden werden die Gruppen der Genotypen abgekürzt wiedergegeben:

- i. Apc^{fl/fl} („Apc“)
- ii. Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} („AK“)
- iii. Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl} („AKPfl“)
- iv. Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+} („AKPr“)

Bei allen Tieren wurden zu den festgesetzten Zeitpunkten, also nach 8, 16 und 24 Wochen (56d, 112d, 168d) die Tumoren, die Lebern und die Lungen entnommen und histologisch analysiert, um so die verschiedenen Genmutationen mit deren Auswirkungen auf das Tumorwachstum miteinander zu vergleichen.

In Abbildung 4A ist die histologische Auswertung der genmanipulierten Mäuse 8 Wochen (56d) nach der Adeno-Cre Injektion zu erkennen. Die im Apc-Gen mutierten Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt größtenteils (n=6; 86%) nicht-invasive Adenome und nur ein Tier (n=1; 14%) ein mikroinvasives Karzinom, (Tabelle 1). Das früheste Tumorwachstum war 13 Tage post OP. Wurde zusätzlich die Mutation im Kras-Gen aktiviert, erhöhte sich die Anzahl an mikroinvasiven Karzinome um mehr als das Doppelte (n=3; 38%) und die restlichen Tumoren

(n=5; 62%) wurden als Adenome klassifiziert (Tabelle 2). Das früheste Tumorwachstum lag auch hier bei 13 Tagen post OP. Bei den AKPr-Mäuse, bei welchen zusätzlich zu den anderen beiden Mutationen noch die Punktmutation im p53 aktiviert wurde, steigerte sich die Malignität (grenzwertig signifikant, $p=0,086$, χ^2 Test) verglichen mit den AK-Mäusen, was dazu führte, dass hier nach 8 Wochen (56d) ein Tier ein Adenom (n=1; 17%) und zwei Tieren mikroinvasive Karzinome (n=2; 33%) und bereits drei Tiere (n=3; 50%) invasive Karzinome entwickelten (Tabelle 3). 12 Tage post OP wurde in dieser Gruppe das erste Tumorwachstum festgestellt. Fand zusätzlich zu den Mutationen im Apc und Kras eine Nullmutation des p53 statt, so zeigten 40% (n=2) dieser AKPfl-Mäuse nach acht Wochen (56d) Adenome und eine höhere Anzahl (n=3; 60%) invasive Karzinome. Mikroinvasives Tumorwachstum wurde nicht beobachtet (Tabelle 4). Hier fand das früheste Tumorchstum 12 Tage post OP statt.

Tabelle 1 Tumorwachstum bei Apc-Mäusen nach 56 Tagen

Apc d56		
	n	%
gesamt	7	100
Adenome	6	86
mikroinvasive Karzinome	1	14
Invasive Karzinome	0	0

Apc, Apc^{fl/fl} Maus.

Tabelle 2 Tumorwachstum bei AK-Mäusen nach 56 Tagen

Apc + Kras d56		
	n	%
gesamt	8	100
Adenome	5	62
mikroinvasive Karzinome	3	38
Invasive Karzinome	0	0

AK, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} Maus.

Tabelle 3 Tumorwachstum bei AKPr-Mäusen nach 56 Tagen

Apc + Kras + p53 R172H d56		
	n	%
gesamt	6	100
Adenome	1	17
mikroinvasive Karzinome	2	33
Invasive Karzinome	3	50
G2	1	34
G3	2	66
G4	0	0

AKPr, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+} Maus. G2, mäßig differenziert. G3, niedrig differenziert. G4, entdifferenziert.

Tabelle 4 Tumorwachstum bei AKPf-Mäusen nach 56 Tagen

Apc + Kras + p53 floxed d56		
	n	%
gesamt	5	100
Adenome	2	40
mikroinvasive Karzinome	0	0
Invasive Karzinome	3	60
G2	0	0
G3	3	100
G4	0	0

AKPf, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl} Maus. G2, mäßig differenziert. G3, niedrig differenziert. G4, entdifferenziert

Abbildung 4B zeigt die Tumorentwicklung nach 16 Wochen (112d). Zu diesem Zeitpunkt konnte man bei den Apc-Mäusen mikroinvasive Karzinome (n=4; 80%) und nur ein nicht-invasives Adenom (n=1; 20%) detektieren. Invasives Tumorwachstum wurde in dieser Gruppe nach 16 Wochen (112d) nicht beobachtet (Tabelle 5). Ähnlich verhielt sich das

Tumorstadium der AK-Mäuse; nach 16 Wochen (112d) zeigte der Großteil der Mäuse (n=7; 88%) mikroinvasive Karzinome und bei einem Tier (n=1; 12%) wurde der Tumor als Adenom klassifiziert. Invasives Tumorstadium konnte auch hier nicht beobachtet werden (Tabelle 6). Alle AKPr-Mäuse hatten nach 16 Wochen (112d) mikroinvasive Veränderungen, wobei zwei Tiere (n=2; 33%) mikroinvasive Karzinome vorwiesen und der Rest (n=4; 67%) invasive Karzinome zeigte (Tabelle 7). Bei den AKPfl-Mäusen konnte mit 86% (n=6) invasiver Karzinome eine erhöhte Rate invasiver Tumore festgestellt werden, allerdings zeigte noch ein Tier (n=1; 14%) das Wachstum eines Adenoms (Tabelle 8).

Insgesamt wurde auch nach 16 Wochen (112d) bei den AKPr-Mäusen sowie bei den AKPfl-Mäusen, also solche mit Mutationen im p53, eine signifikant höhere Frequenz an invasiven Tumoren detektiert, verglichen mit den Tumoren der AK-Mäuse ($p=0,003$ bzw. $p=0,0007$). Auch die Aggressivität des Tumorstadiums bei AKPr- und AKPfl-Mäusen war zu diesem Zeitpunkt signifikant höher, als bei den Tieren, welche nur Mutationen im Apc und / oder Kras trugen ($p=0,0002$).

Tabelle 5 Tumorstadium bei Apc-Mäusen nach 112 Tagen

Apc d112		
	n	%
gesamt	5	100
Adenome	1	20
mikroinvasive Karzinome	4	80
Invasive Karzinome	0	0

Apc, Apc^{fl/fl} Maus.

Tabelle 6 Tumorwachstum bei AK-Mäusen nach 112 Tagen

Apc + Kras d112		
	n	%
gesamt	8	100
Adenome	1	12
mikroinvasive Karzinome	7	88
Invasive Karzinome	0	0

AK, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} Maus.

Tabelle 7 Tumorwachstum bei AKPr-Mäusen nach 112 Tagen

Apc + Kras + p53 R172H d112		
	n	%
gesamt	6	100
Adenome	0	0
mikroinvasive Karzinome	2	33
Invasive Karzinome	4	67
G2	0	0
G3	2	50
G4	2	50

AKPr, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+} Maus. G2, mäßig differenziert. G3, niedrig differenziert. G4, entdifferenziert.

Tabelle 8 Tumorwachstum bei AKPfl-Mäusen nach 112 Tagen

Apc + Kras + p53 floxed d112		
	n	%
gesamt	7	100
Adenome	1	14
mikroinvasive Karzinome	0	0
Invasive Karzinome	6	86
G2	0	0
G3	0	0
G4	6	100

AKPfl, Apc^{fl/fl}/Kras^{LSL-G12D/+}/Tp53^{fl/fl} Maus. G2, mäßig differenziert. G3, niedrig differenziert. G4, entdifferenziert.

In Abbildung 4C ist die Tumordifferenzierung nach 24 Wochen (168d) abzulesen. Nach dieser Zeit wurde in jeder Genotypgruppe auch das Wachstum invasiver Karzinome beobachtet. Bei den Apc-Mäusen wurden ausschließlich invasive Karzinome (n=2; 40%) oder mikroinvasive Karzinome (n=3; 60%) detektiert, (Tabelle 9). Die AK-Mäuse wiesen eine höhere Anzahl an invasiven Karzinomen (n=3; 60%) und mikroinvasiven Karzinomen (n=2; 40%) auf, verglichen mit den Tieren nach 16 Wochen (112d), (Tabelle 10). Bei den AKPr-Mäusen zeigte zu diesem Zeitpunkt noch ein Tier (n=14%) ein invasives Adenom und der Großteil der Tiere (n=6; 86%) entwickelte invasive Karzinome (Tabelle 11). Anders verhielt sich das bei den AKPfl-Mäusen, welche nach 24 Wochen (168d) überwiegend invasive Karzinome (n=4; 80%) entwickelten. Bei einer Maus wurde nach dieser Zeit ein mikroinvasives Karzinom (n=1; 20%) detektiert (Tabelle 12). Wie auch nach acht Wochen (56d) und nach 16 Wochen (112d) ist das Tumorwachstum nach 24 Wochen (168d) bei den AKPfl-Mäusen signifikant (p=0,049) invasiver als das der AKPr-Mäuse.

Tabelle 9 Tumorwachstum bei Apc-Mäusen nach 168 Tagen

Apc d168		
	n	%
gesamt	5	100
Adenome	0	0
mikroinvasive Karzinome	3	60
Invasive Karzinome	2	40
G2	0	0
G3	2	100
G4	0	0

Apc, Apc^{fl/fl} Maus. G2, mäßig differenziert. G3, niedrig differenziert. G4, entdifferenziert.

Tabelle 10 Tumorwachstum bei AK-Mäusen nach 168 Tagen

Apc + Kras d168		
	n	%
gesamt	5	100
Adenome	0	0
mikroinvasive Karzinome	2	40
Invasive Karzinome	3	60
G2	1	33
G3	2	67
G4	0	0

AK, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} Maus. G2, mäßig differenziert. G3, niedrig differenziert. G4, entdifferenziert.

Tabelle 11 Tumorwachstum bei AKPr-Mäusen nach 168 Tagen

Apc + Kras + p53 R172H d168		
	n	%
gesamt	7	100
Adenome	1	14
mikroinvasive Karzinome	0	0
Invasive Karzinome	6	86
G2	0	0
G3	2	33
G4	4	67

AKPr, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+} Maus. G2, mäßig differenziert. G3, niedrig differenziert. G4, entdifferenziert.

Tabelle 12 Tumorwachstum bei AKPfI-Mäusen nach 168 Tagen

Apc + Kras + p53 floxed d168		
	n	%
gesamt	5	100
Adenome	0	0
mikroinvasive Karzinome	1	20
Invasive Karzinome	4	80
G2	0	0
G3	1	25
G4	3	75

AKPfI, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl} Maus. G2, mäßig differenziert. G3, niedrig differenziert. G4, entdifferenziert.

Des Weiteren wurde durch das T-Staging die lokale Primärtumorausdehnung bei allen Mäusen nach 24 Wochen (168d) (Abbildung 4D) bestimmt. Dabei steht T1 für eine Tumorgroße unter 2cm, T2 für eine Tumorgroße von 2cm bis 5cm, T3 für eine Tumorgroße über 5cm und T4 für die Tumordinfektion der Haut. Sowohl die Apc-Mäuse, als auch die AK-Mäuse zeigten nach dieser Zeit ausschließlich T1-Tumoren. Bei den AKPr-Mäusen konnten

alle Tumorstadien von T1-T4 detektiert werden und die AKPfl-Mäuse wiesen zum überwiegenden Teil T4-Tumorstadien auf. Dadurch wird die Steigerung der Invasivität des Tumorwachstums mit jeder hinzukommenden Genmutation, vom APC über KRAS bis zu TP53 ($p=0,15$) verdeutlicht. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ereignissen, welche in der humanen Adenom-Karzinom-Sequenz vorkommen (s.2.1.2.).

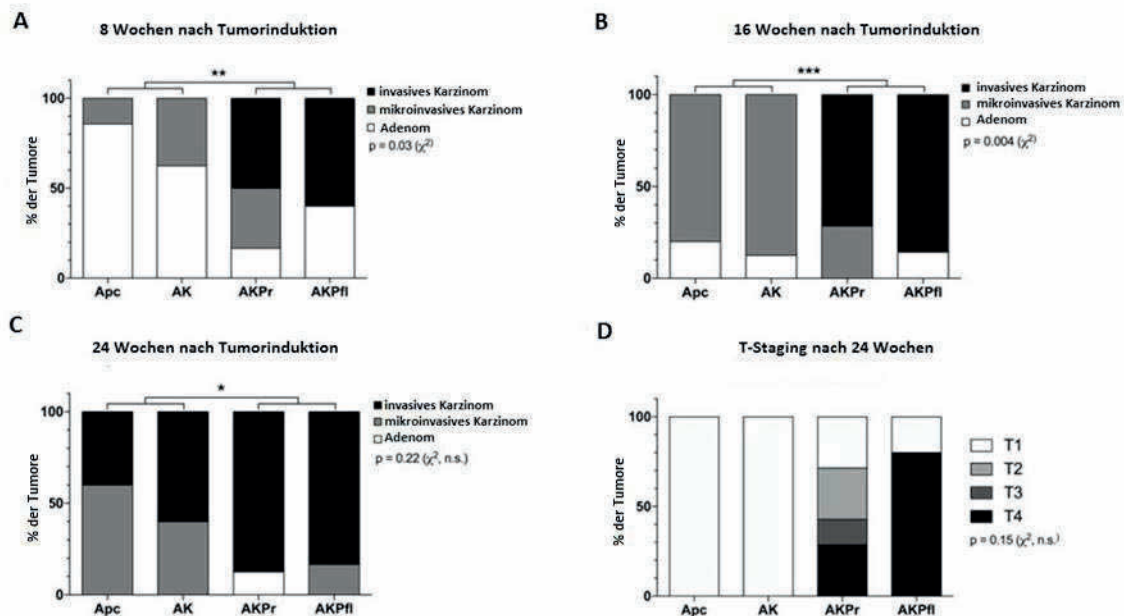


Abbildung 4 Tumorentwicklung und T-Staging

A 8 Wochen nach Tumorinduktion durch AdenoCre-Infektion. **B** 16 Wochen nach Tumorinduktion durch AdenoCre-Infektion. **C** 24 Wochen nach Tumorinduktion durch AdenoCre-Infektion **D** T-Staging nach 24 Wochen bei Apc-, AK-, AKPr- und AKPfl-Mäusen.

T1= Tumor <2cm; T2= Tumor 2-5cm; T3= Tumor <5cm, T4= Tumorerinfiltration der Haut.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Apc, Apc^{fl/fl} Maus; AK, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} Maus; AKPr, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+} Maus; AKPfl, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl} Maus.

Die histologische Tumorauswertung in H/E-Färbung der Mäuse dieses GEMM veranschaulicht, dass die Tiere fast ausschließlich solche Adenokarzinome entwickelten, wie sie auch beim humanen kolorektalen Adenokarzinom vorkommen (Abbildung 5).

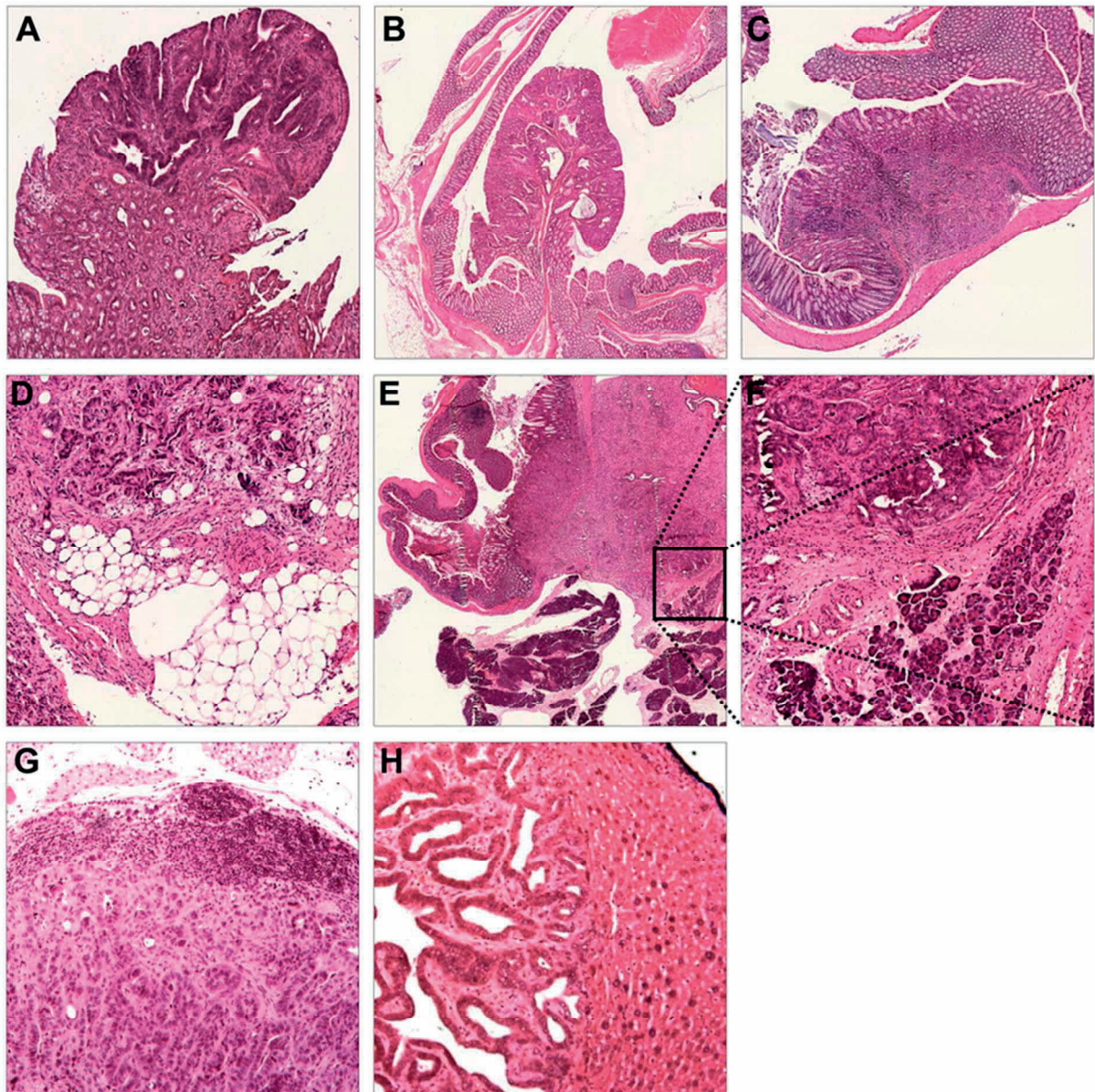


Abbildung 5 Histologie

A Villöses Adenom mit hochgradiger intraepithelialer Neoplasie (Apc,10x). **B** Adenom mit intramukosalem Karzinom (AK,2x). **C** Frühes Adenokarzinom, welches in die Submukosa eindringt (AK,4x). **D** Lokal fortgeschrittenes Adenokarzinom, welches in perikolisches Fettgewebe eindringt (AKPfl,10x). **E** Lokal fortgeschrittenes Adenokarzinom, welches in pankreatisches Azinuszellgewebe eindringt (AKPf,2x). **F** Vergrößerung (10x) von **E**. **G** Mesenteriallymphknotenmetastase (AKPr,10x). **H**. Lebermetastase (AKPr, 10x).

Apc, Apc^{fl/fl} Maus; AK, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} Maus; AKPr, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+} Maus; AKPfl, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl} Maus.

Alle invasiven Karzinome wurden einem pathologischen Grading unterzogen (Tabelle 1-12). Die Beurteilung des Differenzierungsgrades der Tumoren wurde mit Hilfe eines standardisierten Grading-Systems vorgenommen. Dieses reicht von gut differenziert (G1) über mäßig differenziert (G2) und niedrig differenziert (G3) bis zu undifferenziert (G4).

Nach 56 Tagen wurden alle invasiven Karzinome (n=3) der AKPfl-Mäuse in Grad 3 (n=3; 100%) und die der AKPr-Mäuse (n=3) in Grad 2 (n=1; 34%) und Grad 3 (n=2; 66%) eingeteilt (Abbildung 6A). Acht Wochen (112d) später differenzierten sich die Tumoren weiter und alle invasiven Karzinome der AKPfl-Mäuse (n=6) wurden als Grad 4 (n=6; 100%) klassifiziert. Die invasiven Karzinome der AKPr-Mäuse (n=4) entwickelten sich nach dieser Zeit sowohl in Grad 3 (n=2; 50%) als auch in Grad 4 (n=2; 50%) (Abbildung 6B). Nach 24 Wochen (168d) wurden auch bei zwei Apc Mäusen (n=2) und bei zwei AK-Mäusen (n=3) invasive Karzinome detektiert. Die Apc-Mäuse zeigten nach dieser Zeit ausschließlich Karzinome, welche in Grad 3 (n=2; 100%) eingestuft wurden, wobei die AK-Mäuse sowohl G2 (n=1; 33%) als auch G3 Karzinome (n=2; 67%) zeigten. Die invasiven Karzinome der AKPfl-Mäuse (n=4) wurden nach dieser Zeit histologisch nur bei einer Maus in Grad 3 (n=1, 25%) und bei den restlichen Tieren in Grad 4 (n=3; 75%) eingestuft. Ähnlich verhielt es sich bei den invasiven Karzinomen der AKPr-Mäuse (n=6), bei denen ebenfalls Grad 3 (n=4; 67%) und Grad 4 (n=2; 33%) analysiert wurde (Abbildung 6C).

Das onkogene Potential von p53 wird deutlich, vergleicht man Abbildung 6A mit 6B. So entwickelten sich die invasiven Karzinome der AKPfl-Mäuse innerhalb 8 Wochen ausnahmslos von Grad 3 zu Grad 4.

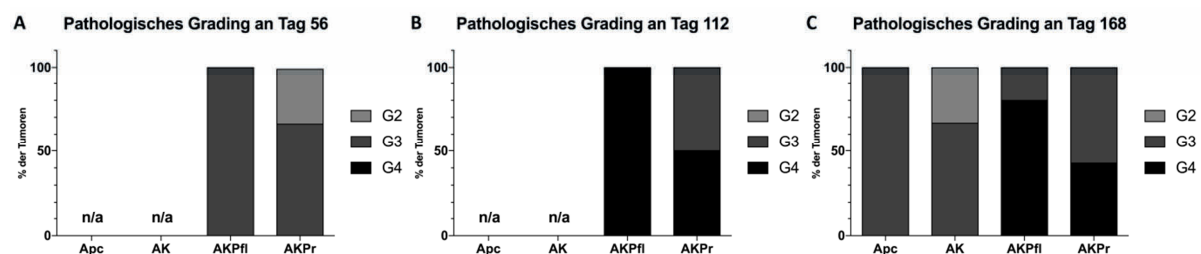


Abbildung 6 Differenzierungsgrad der Tumoren

A Nach 8 Wochen (56d). **B** nach 16 (112d) Wochen. **C** nach 24 Wochen (168d) bei den Apc-, AK-, AKPr- und AKPfl-Mäusen.

Apc, Apc^{fl/fl} Maus; AK, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} Maus; AKPr, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+} Maus; AKPfl, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl} Maus. G2, mäßig differenziert. G3, niedrig differenziert. G4, entdifferenziert.

Die Auswirkungen der verschiedenen Genmutationen auf die Lebensdauer wurde an insgesamt 60 Tieren, 15 von jeder Genotypgruppe, beobachtet. Diese Tiere wurden sobald sie stark vermindertes Allgemeinbefinden zeigten getötet und der Tumor, sowie Leber und Lunge wurden entnommen und histologisch analysiert.

Zwischen Apc- und AK-Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit beobachtet werden (mittlere Überlebenszeit 258 Tage (Apc-Mäuse) vs. 302 Tage (AK-Mäuse), $p=0,97$, log rank Test). Anders verhielt sich das, wenn die weitere Mutation im p53 hinzukam. In Abbildung 7 wird verdeutlicht, dass die Mäuse, welche die Punktmutation von p53 trugen (AKPr-Mäuse) eine (grenzwertig signifikant) geringere mittlere Überlebenszeit (186 Tage, $p=0,16$) aufwiesen, als die Mäuse, bei welchen die Nullmutation des p53 aktiviert wurde (AKPfl-Mäuse) und eine mittlere Überlebenszeit von 89 Tagen ($p<0,0001$) hatten.

Die Tiere der AKPfl-Gruppe starben überwiegend ($n=8$; 53%) an Obstruktionen des Kolons was dem aggressiven Tumorwachstum geschuldet ist (Abbildung 8A).

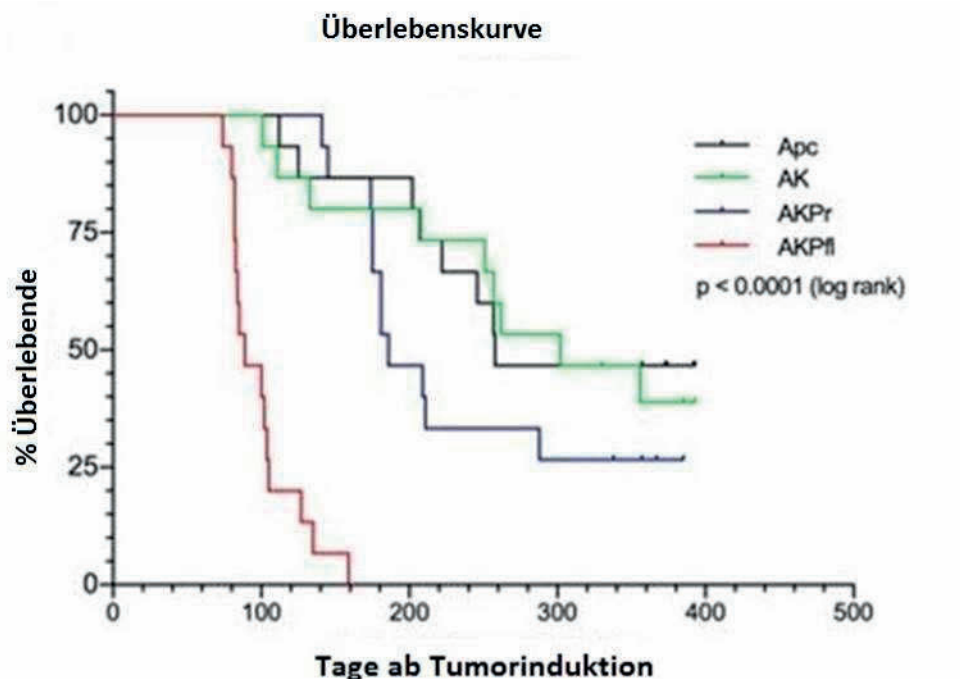


Abbildung 7 Überlebenskurve

Vergleich der Überlebenszeit abhängig vom Genotyp

Apc, Apc^{fl/fl} Maus; AK, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} Maus; AKPr, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+} Maus; AKPfl, Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl} Maus.

Metastasenwachstum konnte bei insgesamt 5 Tieren ($n=5$; 4%) analysiert werden. Die AKPfl-Mäuse entwickelten zwar invasive und schnell wachsende Tumore, zeigten aber keine Metastasierung. Anders verhielt sich die Karzinogenese der AKPr-Mäuse, denn hier wurden sowohl Lymphknotenmetastasen ($n=2$; 28,6%) an Tag 168 (Abbildung 5G) als auch

Lebermetastasen bei einer Maus (n=1; 20%) nach 112 Tagen und bei zwei Mäusen (n=2; 28,6%) nach 168 Tagen (Abbildung 8B und 5H) detektiert.

Lungenmetastasen wurden nur bei einer AK-Maus der Überlebensgruppe, welche nach 262 Tagen getötet wurde, beobachtet.

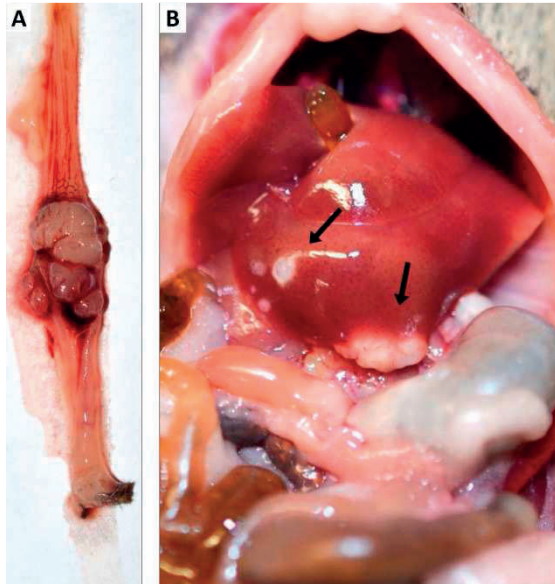


Abbildung 8 Präparation

A distales Kolon mit Karzinom in einer AKPfl-Maus. **B** Lebermetastase(Pfeile) in einer AKPr-Maus.

AKPr, $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+}$ Maus; AKPfl, $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl}$ Maus.

5. Diskussion

Aufgrund der noch immer inakzeptabel hohen Mortalität des kolorektalen Karzinoms sind Verbesserungen in Diagnostik und Therapie dieser Erkrankung dringend notwendig. Zur Entwicklung neuer Therapieformen sind zuverlässige und aussagekräftige biologische Modelle mit reproduzierbaren Tumorwachstums- und Metastasierungsraten essentiell.

Klassische Mausmodelle wie z.B. subkutane Xenografts sind einfach und kostengünstig herzustellen. Aufgrund der humanen und meist anaplastischen Zelllinien ist ihre Aussagefähigkeit jedoch sehr limitiert. Die sich entwickelnden Tumoren sind meist wie die verwendeten Zelllinien entdifferenziert und wachsen sehr schnell, im Gegenzug sprechen sie jedoch auch sehr gut auf viele zytotoxische Therapien an. Aufgrund des fremden Tumorstromas sind molekularbiologische Fragestellungen selten adäquat zu beantworten (Roper und Hung 2012).

GEMMs haben diese Limitationen nicht. Sie basieren generell auf der Induktion von Tumor-spezifischen Mutationen direkt im Zielgewebe und führen so dazu, dass die Maus ihren eigenen Tumor entwickelt. Diese Tumoren verhalten sich biologisch den humanen Tumoren sehr ähnlich, insbesondere akkumulieren sie im weiteren Verlauf neue Mutationen und metastasieren auch (Hingorani et al. 2005; Singh et al. 2012). Für diese Arbeit wurde ein neuartiges Mausmodell entwickelt, welches das Tumorwachstum im Kolon von Mäusen repräsentiert und dabei die Adenom-Karzinom-Sequenz des KKR, wie in der Humanmedizin beschrieben, widerspiegelt. Hierbei spielen drei Mutationen eine wesentliche Rolle. Diese sind im Apc-Gen, im Kras-Gen und im Tp53-Gen. Dieses Modell wird bereits beschrieben (Hung et al. 2010), hier werden jedoch lediglich Mutationen im Apc und Kras verwendet, woraufhin sich nicht-metastasierende Tumoren entwickeln. In der hier vorliegenden Arbeit wird dieses Modell um zwei verschieden alterierte Tp53-Allele ergänzt.

Die hierfür gezüchteten Mäuse des Stammes C57BL/6N tragen konditionelle Mutationen im Apc-Gen, im Kras-Gen und im Tp53-Gen entweder alleine oder in Kombination. Um eine frühe Letalität zu verhindern, verwenden wir die Genmutationen in gefloxter Form und können diese durch Infektion des Kolons mit Adenoviren, welche für Cre-Rekombinase kodieren, gezielt lokal aktivieren. Nach erfolgreicher Operation werden die Mäuse zweimal wöchentlich koloskopiert, um den Zeitpunkt des Tumorwachstums festzustellen. Danach werden die Tiere zu drei verschiedenen Zeitpunkten (56d, 112d, 168d) zur Probengewinnung schmerzfrei getötet. Zusätzlich gibt es eine Überlebensgruppe, in der der Einfluss des Genotyps auf das Überleben der Tiere

untersucht wird. Die Tumoren werden histologisch untersucht und nach Differenzierungsgraden eingestuft.

In diesem Mausmodell entwickeln 207 (83%) Mäuse kolorektale Tumoren. Die Tiere, die als Kontrollgruppe dienen, zeigen wie erwartet kein Tumorwachstum. Hier werden jeweils 2 Kontrolltiere für jede Genotypgruppe verwendet. Anstatt der Infektion mit dem Adenovirus wird eine Instillation mit 0,9%igen NaCl durchgeführt. Außerdem gibt es zusätzlich als Kontrolle Wildtypmäuse, die keine genetischen Mutationen tragen und genau wie die genmanipulierten Mäuse behandelt werden.

Die fehlende Tumorentwicklung der restlichen Mäuse (n=31; 17%) kann darin begründet werden, dass sie vor einer möglichen Tumorentwicklung verstorben sind oder auf Grund schlechten Allgemeinbefindens frühzeitig aus dem Versuch genommen werden mussten.

Das erste Ereignis in der Adenom-Karzinom-Sequenz ist die Mutation im Apc-Gen. Apc fungiert als Tumorsuppressor-Gen und verhindert somit willkürliches Zellwachstum. Eine Inaktivierung dieses Gens führt zur Bildung von Adenomen (Powell et al. 1992). Auch in der vorliegenden Arbeit führt die Apc-Mutation bei dem Großteil (n=6; 86%) der Mäuse zur Bildung von Adenomen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen der Veröffentlichung von Hung aus dem Jahr 2010 (Hung et al. 2010). Der Zeitpunkt der Tumorentwicklung stellt sich im Vergleich mit Hung unterschiedlich dar. Der früheste Zeitpunkt der Tumorerkennung beträgt in dem hier vorgestellten Modell 13 Tage post OP. Die Veröffentlichung von Hung gibt als frühesten Zeitpunkt der Tumorentdeckung sechs Wochen an. Die deutlich frühere Tumorentwicklung in dieser Arbeit könnte an der höheren Konzentration des verwendeten Adenovirus liegen: diese beträgt bei diesem Modell 10^{11} pfu/ml, wobei Hung eine Konzentration von 10^9 pfu /ml verwendet (Hung et al. 2010). In einer Veröffentlichung von Shibata (1997) wird das erste Mal beschrieben, dass bei Mäusen mit geflochten Apc-Genmutationen eine Aktivierung mit Hilfe des Adeno-Cre-Rekombinasesystems herbeigeführt wird. Der früheste Zeitpunkt der Tumorentdeckung wird nach drei Monaten beschrieben. Allerdings werden die Tumoren nicht durch Koloskopie detektiert, sondern mittels Obduktion post mortem (Shibata 1997).

Die histologische Auswertung der Tumoren, welche durch die Apc-Mutation entstanden sind, belegt Invasivität und Aggressivität des Tumorwachstums mit zunehmendem Alter. Die vorgelegte Studie diagnostiziert bei fast allen Apc-Mäusen (n=4; 80%), welche nach 16 Wochen getötet werden, mikroinvasive Karzinome und nur einmal (n=1; 20%) das Wachstum eines Adenoms. Nach 24 Wochen können wir bei allen Mäusen histologisch eine Weiterentwicklung des Tumorwachstums zu teils mikroinvasiven und teils invasiven Karzinomen detektieren. In der Arbeit von Shibata können ähnliche Ergebnisse,

allerdings nach einem viel längeren Zeitraum beobachtet werden: Mäuse, welche nach Aktivierung der Apc-Genmutation durch Adeno-Cre nach einem Jahr getötet werden zeigen histologisch zu 50 % invasive Karzinome (Shibata 1997). Die histologische Auswertung in der Arbeit von Hung ergibt für diese Genmutation nach sechs Wochen bei fast allen Tieren (n=56; 93%) die Entwicklung zu Adenomen und bei einer nur sehr geringen Anzahl (n=4; 7%) eine Weiterdifferenzierung zu Karzinomen wobei nach 18 Wochen das früheste Wachstum von Karzinomen dokumentiert wird (Hung et al. 2010), was in der vorliegenden Arbeit schon nach 16 Wochen beobachtet werden kann. In einer ähnlichen Arbeit von Xue (2010) wird nach 20 Wochen bei nur 20% der Mäuse ein Übergang von Adenome in Adenokarzinome beobachtet.

Bei dieser Genmutation wird in unserem genetisch induzierten Mausmodell kein Metastasenwachstum beobachtet. Auch in der zur Verfügung stehenden Literatur gibt es keine Veröffentlichungen, welche Metastasierung bei diesem Genotyp beschreiben.

Die zweite entscheidende Rolle in der Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms spielen die ras-Onkogene, in der kolorektalen Karzinogenese vor allem Kras. Dessen Aktivierung bewirkt weitere Proliferation und Dysplasie des Kolonepithels bis hin zur Entwicklung von Adenokarzinomen (Tuveson et al. 2004). In dem GEMM der vorliegenden Arbeit wird dieses Geschehen gut rekapituliert. Hierfür werden Mäuse mit Mutationen sowohl im Apc-Gen, als auch im Kras-Gen (AK-Mäuse) in gefloxter Form gezüchtet und die Genmutation mittels Adeno-cre-Rekombinase aktiviert. Dabei entwickeln mehr Mäuse einen Tumor im Kolon, als solche, die nur die Apc-Mutation tragen. Dies verdeutlicht, dass durch Mutationen sowohl im Apc-Gen als auch im Kras-Gen die Tumorrage steigt. Diese Beobachtung beschreiben auch andere Autoren (Tuveson et al. 2004; Hung et al. 2010; Krasinskas 2011; Armaghany et al. 2012; Fearon und Wicha 2014). Die Anzahl der Tiere (n=47; 90%), welche nach der Virusinstillation Tumoren entwickeln liegt jedoch im direkten Vergleich mit denen aus der Veröffentlichung von Hung niedriger (n=53; 96%). Allerdings liegt der Zeitpunkt der frühesten Tumorentdeckung in unserem Modell bei 13 Tagen post OP, wobei andere Autoren drei Wochen angeben (Hung et al. 2010).

Bei den AK-Mäusen werden in dieser Arbeit keine Lebermetastasen entdeckt. In der Veröffentlichung von Hung et al. (2010) wird das Wachstum von Lebermetastasen bei 5 Mäusen (20 %) beschrieben. Als frühesten Zeitpunkt gibt er dafür 24 Wochen an. Die fehlende Lebermetastasierung für diese Genotypgruppe in unserem GEMM, kann daran liegen, dass der späteste Zeitpunkt für die Untersuchung auf Metastasierung bereits nach 24 Wochen festgelegt wird. Wahrscheinlich zeigen nach längerer Zeit mehr Mäuse Metastasenwachstum. Allerdings wird die Überlebensdauer der Mäuse durch die

geringere Differenzierung und dadurch schnelleres lokales Tumorwachstum beeinträchtigt.

Die histologische Auswertung der AK-Mäuse verdeutlicht, dass auch die Invasivität der Tumoren durch die zusätzliche Genmutation im Kras verstärkt wird. So entdifferenzieren bereits nach acht Wochen mehr als ein Drittel der Adenome zu Karzinomen (n=3; 38%) und nach weiteren acht Wochen findet bei fast allen (n=7; 88%) eine Weiterentwicklung zum sowohl mikroinvasiven als auch invasiven Karzinom statt. Ähnliche histologische Ergebnisse werden in den Versuchen von anderen Autoren erzielt. Bei selben Genmutationen wird etwa Zweidrittel als Adenome und Eindrittel als Karzinome klassifiziert. Allerdings findet bei dem Mausmodell von Hung und Mitarbeiter (2010) die früheste Weiterentwicklung zu Karzinomen erst nach 20 Wochen statt (Hung et al. 2010).

Ein weiteres Ereignis in der Adenom-Karzinom-Sequenz betrifft Mutationen in TP53. Diese führt zu verstärkt onkogenem Potential und in der Folge zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Metastasierung. Diese ist ausschlaggebend für die Überlebensrate in KRK-Patienten (O'Connell et al. 2004), welche nach Auffinden von Metastasen unter 10 % liegt (Jemal et al. 2011). In diversen Veröffentlichungen kann gezeigt werden, dass p53 das onkogene Potential erhöht (Baker et al. 1989; Harris 1996; Levine 1997; Morton et al. 2009; Doyle et al. 2010; Liu et al. 2013). Begründet ist dies in der doppelten Funktion von p53. Kommt es zu einer Beeinträchtigung oder auch zum vollständigen Verlust des Wildtyp-Allels, führt dies zum Funktionsverlust als Tumorsuppressorgen. Zusätzlich werden aufgrund der Punktmutation weitere onkogene Eigenschaften aktiviert (Olive et al. 2004; Jackson 2005).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass sich durch die Nullmutation im p53 die Anzahl anaplastischer und maligner Tumoren erhöht. Es werden Tiere mit den Genmutationen im Apc, Kras und der Nullmutation von p53 (AKPfl-Maus) in die Versuche genommen. Bei allen Tieren findet eine Aktivierung der Gene durch Adeno-Cre statt.

Die histologische Auswertung verdeutlicht das starke Tumorwachstum durch die Nullmutation von p53 und dem damit verbundenen Funktionsverlust als Tumorsuppressorgen, was so auch in der Literatur beschrieben wird (Onuma et al. 2013): Wir beobachten schon nach acht Wochen bei 60% der Tiere (n=3) die Entwicklung zu invasiven Karzinomen, diese steigt im weiteren Verlauf an und nach 24 Wochen sind bei fast allen Mäusen (n=4; 80%) invasive Karzinome histologisch bestätigt. Die Tiere dieser Gruppe zeigen die geringste Überlebenszeit, welche dem starken Tumorwachstums geschuldet ist. So entwickeln 8 Tiere (53%) Darmverschlüssen auf Grund des massiven Wachstums. Keine dieser Mäuse lebt länger als 168 Tage. Die

Punktmutation des p53 scheint sich anders auf das Tumorstadium und die Metastasierung auszuwirken.

Um dies zu untersuchen werden in dieser Arbeit Mäuse mit Genmutationen im Apc und Kras sowie der Punktmutation im p53 (AKPr-Maus) gezüchtet. Zwar entwickeln nach acht Wochen die meisten Mäuse Karzinome (n=5; 88%), was sich aber in den Folgewochen nicht deutlich steigert. Allerdings beobachten wir bei dieser Mutation Metastasenbildung. Sowohl im Mesenteriallymphknoten bei zwei Tieren (n=2; 28,6%) nach 24 Wochen als auch in der Leber, bei einem Tier (n=1; 20%) nach 16 Wochen und bei zwei Tieren (n=2; 28,6%) nach 24 Wochen.

Die Ergebnisse bezüglich der beiden Mutationen in Tp53 deuten darauf hin, dass eine geringe Funktion als Tumorsuppressor erhalten bleibt. Denn die Tumorphasie bei Tieren mit der Punktmutation in diesem Gen schreitet langsamer voran verglichen mit den Tieren, welche einen Funktionsverlust des Gens aufweisen. Die gewonnenen onkogenen Eigenschaften führen allerdings zu einer gesteigerten Metastasierungsrate. Diese Beobachtungen werden in der vorhandenen Literatur ebenfalls von verschiedenen Autoren beschrieben (Olive et al. 2004; Jackson 2005).

Mit dem hier entwickelten Mausmodell kann gezeigt werden, dass die Malignität der bereits in der Publikation von Hung et al. (2010) beschriebenen Tumoren deutlich gesteigert werden kann, wenn zusätzlich zu den Mutationen im Apc-Gen und Kras-Gen eine Mutation in Tp53 hinzukommt. Das verstärkte onkogene Potential wirkt sich auch auf die Metastasierungsrate aus. Denn erst nachdem die Mutation im Tp53 aktiviert wird, kann Metastasenwachstum, bei den AKPr-Mäusen, beobachtet werden.

Vergleicht man die beiden Mutationen im Tp53 miteinander, so zeigen Tiere mit der Nullmutation stets aggressiveres Tumorstadium als solche, bei welchen die Punktmutation des p53 aktiviert wird. Es ist durchaus möglich, dass zum späteren Zeitpunkt der Untersuchung, also bei längerem Tumorstadium, weitere Metastasen auftreten, da in dieser Studie Metastasen nach frühestens 156 Tagen beobachtet werden.

Das hier vorgestellte, neu etablierte Mausmodell erfüllt die meisten Kriterien, welche an ein ideales Mausmodell für die Krebsforschung gestellt werden (Sharpless und Depinho 2006). Dazu zählen 1) eine hohe Penetranz bei einer niedrigen Latenzzeit, 2) genetische Evolution durch sekundäre epigenetische Ereignisse, 3) leichte Durchführung der Beobachtung des Tumorstadiums und der weiteren histologischen Analyse, sowie 4) leichte Handhabung. In der vorliegenden Arbeit wird mit einer durchschnittlichen Tumorentwicklung von 2-4 Wochen nach Tumorstadium eine niedrige Latenzzeit bei

einer hohen Penetranz von 83% erreicht. Dass zusätzlich zu den genetischen Ereignissen weitere sekundäre genetische Veränderungen ausgelöst werden, kann unter anderem durch Funktionsverlust der Tumorsuppressorfunktion des Tp53 nach dessen Genmutation gezeigt werden. Die Beobachtung des Tumorwachstums wird durch die Koloskopie gut und einfach vollzogen und eine histologische Tumoranalyse ist ohne Probleme durchführbar. Die Zucht der Mäuse, sowie die Genotypisierung zum Erreichen des gewünschten Genotyps gestaltet sich effektiv. Das einzige Kriterium bei dem hier vorgestellten genetisch induzierten Mausmodell ist die Operationsmethode. Um die jeweiligen Mutationen zu aktivieren ist diese aufwendig und invasiv. Doch nur durch diese Methode kann gewährleistet werden, dass die Tumorbildung an der gewünschten Stelle im Kolon stattfindet und durch die Koloskopie erreicht werden kann. Andere Methoden zur Tumorinduktion, wie gewebespezifische Cre-Expression, veranlasst Tumorwachstum in anderen Organen wie dem Dünndarm (Robanus-Maandag et al. 2010). Selbst wenn die Cre-Expression auf das Kolon begrenzt werden kann, ist es nahezu unmöglich die Tumoren durch Koloskopie zu erreichen (Xue et al. 2010).

Das hier präsentierte genetisch induzierte Mausmodell imitiert das humane kolorektale Karzinom nicht nur klinisch sondern auch molekular, was tumorgenetische und präklinisch therapeutische Studien ermöglicht. Somit wird durch die Verwendung solcher Mausmodelle in Zukunft weitere Forschungsarbeiten möglich sein, die neue Erkenntnisse zur Molekularbiologie und Behandlung des kolorektalen Karzinoms bringen könnten, um so letztlich die Mortalität dieser Tumorerkrankung zu senken.

6. Zusammenfassung

Das Kolorektale Karzinom (KRK) gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen des Menschen. Die Mortalität in Deutschland liegt bei Männern und Frauen bei 26 000 und die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 60% und ist damit nach wie vor inakzeptabel hoch. Daher sind weitere Verbesserungen in der Diagnostik und der Therapie dieser Erkrankung dringend notwendig. Es existieren zwar bereits einige Tiermodelle zum KRK, jedoch basieren diese meist auf der Injektion von Zelllinien und die Ergebnisse dieser Modelle lassen sich nur bedingt auf den Menschen übertragen. Das hier etablierte genetisch induzierte Mausmodell (GEMM) zeichnet sich dadurch aus, dass es durch gewebspezifische Genveränderungen die Tumoren direkt in der Maus entstehen lässt. Im hier beschriebenen Modell wurden Mutationen nicht nur im Apc-Gen und im Kras-Gen sondern erstmals auch im Tp53- Gen im Kolon der Maus induziert. Die Kombination dieser drei Mutationen kommt im humanen KRK häufig vor und ist maßgeblich an der Adenom-Karzinom-Sequenz beteiligt.

Zur gewebspezifischen und zeitlich gesteuerten Aktivierung der Mutationen wurde das Cre/loxP-System verwendet; die konditionellen Mutationen in der Keimbahn wurden durch lokale Infektion des Kolons mit einem Cre-Adenovirus aktiviert. Verschiedene Mauslinien wurden gezielt verpaart, um die folgenden Genotypen zu erhalten: $Apc^{fl/fl}$ („Apc“), $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+}$ („AK“), $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl}$ („AKPfl“) und $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+}$ („AKPr“). Zur zusätzlichen Untersuchung der onkogenen Funktion von Punktmutationen im Tp53-Gen wurde nicht nur ein konditionelles Knockout-Allel ($Tp53^{fl/fl}$), sondern auch eine konditionelle Hotspot-Mutante von Tp53 (LSL-Tp53 R172H) untersucht. Nach der Infektion mit dem Adenovirus entwickelten 83% (n=207) der Tiere innerhalb weniger Wochen Tumoren im infizierten Darmsegment. Das Tumorstadium wurde durch repetitive Koloskopien überwacht und die Tumoren wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (56d, 112d und 168d) bei jeweils acht Tieren von jedem der vier Genotypen (n=74) entnommen und histologisch untersucht. In einer weiteren Kohorte wurde das Überleben abhängig vom Genotyp der Tumoren bei 60 Tieren gemessen.

Wie erwartet entwickelten und entdifferenzierten sich die Tumoren der AK-Mäuse schneller als jene der Apc-Mäuse. Nach 8 Wochen zeigte ein Tier (n=1; 14%) der Apc-Mäuse das Wachstum eines mikroinvasiven Karzinoms, wobei bei den AK-Mäusen nach dieser Zeit bereits die doppelte Anzahl (n=3; 38%) an mikroinvasiven Karzinomen beobachtet wurde. Bei den AKPfl- und AKPr-Mäusen resultierte sowohl die Punktmutation in Tp53 als auch der vollständige Verlust von Tp53 in rasch wachsenden entdifferenzierten Tumoren. Nach 24 Wochen wurde bei fast allen (n=4; 80%) AKPfl-Mäusen und bei dem Großteil (n=6; 86%) der AKPr-Mäuse die Entwicklung zu invasiven Karzinomen analysiert. Tiere mit einem

vollständigen Tp53-Verlust zeigten insgesamt ein aggressiveres Tumorwachstum verglichen mit Mäusen mit einer Punktmutation in Tp53. Diese Beobachtungen ließen sich auch durch das histologische Grading bestätigen. Während bei den weniger komplexen Genotypen (Apc, AK) nicht-invasive Adenome und gut differenzierte Adenokarzinome auftraten (n=33; 87%), zeigten sich in den Tieren mit Tp53-Veränderungen mehrheitlich (n=26; 72%) schlecht bis entdifferenzierte Karzinome.

Fernmetastasen (n=5; 4%) traten nahezu ausschließlich bei den AKPr-Mäusen auf, was vermuten lässt, dass das verglichen mit den AKPfl-Mäusen langsamere Wachstum zusammen mit der gewonnenen onkogenen Eigenschaft die Metastasenbildung begünstigt. In der Überlebensanalyse zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen höhergradig komplexen Genotypen und dem Überleben der Tiere. Die kürzeste Überlebenszeit zeigten AKPfl-Mäuse, bei denen mehr als die Hälfte (n=8; 53%) an Lokalkomplikationen des schnellen Tumorwachstums verstarben.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass im hier vorgestellte Mausmodell murine kolorektale Karzinome entstehen, die sowohl genetisch als auch klinisch dem humanen Tumorwachstum nahezu identisch sind. Damit sind weitere Forschungsarbeiten möglich, um noch mehr über diese Tumorerkrankung zu erfahren um neue Therapieansätze zu entwickeln, die langfristig die Mortalität senken könnten.

7. Summary

The colorectal cancer (CRC) counts among the most frequent cancer diseases in humans. The mortality in Germany is 26,000 for men and women, and the 5-year survival rate is 60%, which is still unacceptably high. Therefore, further improvements in diagnostics and the therapy of this disease are urgently necessary. In fact, there are already existing some animal models concerning the colorectal cancer, but most of them are based on the injection of cell lines and the results of these models can only conditionally transferred to humans. One of the characteristics of the established genetically engineered mouse model (GEMM) is that the tumours are grown directly in the mouse by tissue-specific gene mutation. In the described model the modifications have not only been induced in the Apc gene and in the Kras wild type gene, but for the first time they have also been induced in the Tp53- gene in the colon of the mouse. The combination of these three mutation types is a frequent case in human CRC and is substantially involved in the adenoma-carcinoma sequence.

For the tissue-specific and time-managed activation of the mutations the Cre/loxP-system has been used; the conditional mutations in the germ line have been activated by local infection of the colon with a Cre-adenovirus. In order to get the following gene types, different mouse lines have been aimingly paired: $Apc^{fl/fl}$ („Apc“), $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+}$ („AK“), $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl}$ („AKPf“) and $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+}$ („AKPr“). For the additional study of the oncogenic function of point mutations in the Tp53 gene there was not only a conditional Knockout-Allel (Tp53 fl/fl) investigated, but also a conditional hotspot mutant of (LSL-Tp53 R172H). After infecting the animals with the adenovirus 83 % (n=207) developed tumours in the infected intestinal segment. The growth of the tumours have been observed by repetitive colonoscopies and the tumours have been extracted from each of the four genotypes (n =74) and histologically examined at three different specific times (56d, 112d and 168d). The survival subject to the tumours genotype has been measured in 60 animals using a further cohort survey.

As expected, the tumours of the AK mice developed and dedifferentiated faster than those of the Apc mice. After 8 weeks, an animal (n =1; 14%) of the Apc mice showed the growth of a microinvasive carcinoma, with twice as many (n =3; 38%) microinvasive carcinomas being observed in the AK mice after this time. In case of the AKPf and AKPr mice, the point mutation in Tp53 as well as the total loss of Tp53 resulted in fast growing dedifferentiated tumours. After 24 weeks, the development to invasive carcinomas was analyzed in all (n = 5; 100%) AKPf mice and in the majority (n =5; 71%) of the AKPr mice. Compared to those mice with a point mutation in Tp53 the animals with a total loss of Tp53 showed all in all a more aggressive growth of the tumours. These observations could also be confirmed by the

histological grading. While in case of the less complex genotypes (Apc, AK) non-invasive adenomas and well differentiated adenocarcinomas appeared (n=33; 87%), the animals with Tp53 modifications showed majority (n=26; 72%) poorly to dedifferentiated carcinomas.

Remote (distant) metastases (n=5; 4%) appeared almost exclusively in AKPr-mice, which leads to the assumption that the - in comparison to the AKPf mice - slower growth in combination with the oncogenic characteristics favours the formation of metastases. The survival analysis showed a clear correlation between higher graded complex genotypes and the survival of the animals. The AKPfl mice showed the shortest survival time, more than the half (n=8; 53%) died due to local complications due to the fast growing tumours.

All things considered it could be shown that in the introduced mouse model murine colorectal carcinoma emerge which are genetically as well as clinically almost identical to the human tumour growth. Thus, further research to get to know more about these tumour diseases is possible in order to develop new therapy approaches which could lower the mortality in the long run.

8. Literaturverzeichnis

Anderson, R D, R E Haskell, H Xia, B J Roessler, B L Davidson

2000 A Simple Method for the Rapid Generation of Recombinant Adenovirus Vectors. *Gene Therapy* 7(12): 1034–1038.

Anton, M, und F L Graham

1995 Site-Specific Recombination Mediated by an Adenovirus Vector Expressing the Cre Recombinase Protein: A Molecular Switch for Control of Gene Expression. *Journal of Virology* 69(8): 4600–4606.

Araki, K, T Imaizumi, K Okuyama, Y Oike, K Yamamura

1997 Efficiency of Recombination by Cre Transient Expression in Embryonic Stem Cells: Comparison of Various Promoters. *Journal of Biochemistry* 122(5): 977–982.

Armaghany, T, J D Wilson, Q Chu, G Mills

2012 Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research: GCR* 5(1): 19–27.

Baker, S J, E R Fearon, J M Nigro, S R Hamilton, A C Preisinger, J M Jessup, P vanTuinen, D H Ledbetter, D F Barker, Y Nakamura, R White, B Vogelstein

1989 Chromosome 17 Deletions and p53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas. *Science (New York, N.Y.)* 244(4901): 217–221.

Bates, R C, und A M Mercurio

2005 The Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Colorectal Cancer Progression. *Cancer Biology & Therapy* 4(4): 365–370.

Bos, J L

1989 Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Research* 49(17): 4682–4689.

Brenner, H, M Hoffmeister, C Stegmaier, G Brenner, L Altenhofen, U Haug

2007 Risk of Progression of Advanced Adenomas to Colorectal Cancer by Age and Sex: Estimates Based on 840,149 Screening Colonoscopies. *Gut* 56(11): 1585–1589.

Bukowski, J A, D Wartenberg, M Goldschmidt

1998 Environmental Causes for Sinonasal Cancers in Pet Dogs, and Their Usefulness as Sentinels of Indoor Cancer Risk. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 54(7): 579–591.

Church, E M, C J Mehlhaff, A K Patnaik

1987 Colorectal Adenocarcinoma in Dogs: 78 Cases (1973-1984). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191(6): 727–730.

Dangles-Marie, V, M Pocard, S Richon, L-B Weiswald, F Assayag, P Saulnier, J-G Judde, J-L Janneau, N Auger, P Validire, B Dutrillaux, F Praz, D Bellet, M-F Poupon

2007 Establishment of Human Colon Cancer Cell Lines from Fresh Tumors versus Xenografts: Comparison of Success Rate and Cell Line Features. *Cancer Research* 67(1): 398–407.

Doyle, B, J P Morton, D W Delaney, R A Ridgway, J A Wilkins, O J Sansom.

2010 p53 Mutation and Loss Have Different Effects on Tumourigenesis in a Novel Mouse Model of Pleomorphic Rhabdomyosarcoma. *The Journal of Pathology* 222(2): 129–137.

Evans, J P, P A Sutton, K B Winiarski, S W Fenwick, H Z Malik, D Vimalachandran, E M Tweedle, E Costello, D H Palmer, B K Park, N R Kitteringham

2015 From Mice to Men: Murine Models of Colorectal Cancer for Use in Translational Research. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.

Fearnhead, N S, M P Britton, W F Bodmer

2001 The ABC of APC. *Human Molecular Genetics* 10(7): 721–733.

Fearon, E R, B Vogelstein

1990 A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61(5): 759–767.

Fearon, E R, M S Wicha

2014 KRAS and Cancer Stem Cells in APC-Mutant Colorectal Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 106(2): djt444–djt444.

Freed-Pastor, W A, C Prives

2012 Mutant p53: One Name, Many Proteins. *Genes & Development* 26(12): 1268–1286.

Friedrich, A, F Kullmann

2003 [Familial adenomatous polyposis syndrome (FAP): pathogenesis and molecular mechanisms]. Medizinische Klinik (Munich, Germany: 1983) 98(12): 776–782.

Gamblin, R M, J E Sagartz, C G Couto

1997 Overexpression of p53 Tumor Suppressor Protein in Spontaneously Arising Neoplasms of Dogs. American Journal of Veterinary Research 58(8): 857–863.

Gearhart, J, E E Pashos, M K Prasad

2007 Pluripotency Redux--Advances in Stem-Cell Research. The New England Journal of Medicine 357(15): 1469–1472.

Hanahan, D, R A Weinberg

2000 The Hallmarks of Cancer. Cell 100(1): 57–70.

Hardy, S, M Kitamura, T Harris-Stansil, Y Dai, M L Phipps

1997 Construction of Adenovirus Vectors through Cre-Lox Recombination. Journal of Virology 71(3): 1842–1849.

Harris, C C

1996 p53 Tumor Suppressor Gene: From the Basic Research Laboratory to the Clinic--an Abridged Historical Perspective. Carcinogenesis 17(6): 1187–1198.

Hayes, H M, Jr, J F Fraumeni Jr

1977 Epidemiological Features of Canine Renal Neoplasms. Cancer Research 37(8 Pt 1): 2553–2556.

Hingorani, S R, L Wang, A S Multani, C Combs, T B Deramaudt, R H Hruban, A K Rustgi, S Chang, D A Tuveson

2005 Trp53R172H and KrasG12D Cooperate to Promote Chromosomal Instability and Widely Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. Cancer Cell 7(5): 469–483.

Holt, P E, V M Lucke

1985 Rectal Neoplasia in the Dog: A Clinicopathological Review of 31 Cases. The Veterinary Record 116(15): 400–405.

Hung, K E, M A Maricevich, L G Richard, W Y Chena, M P Richardsona, A Kuninb, R T Bronsond, U Mahmoodb, R Kucherlapatic

2010 Development of a Mouse Model for Sporadic and Metastatic Colon Tumors and Its Use in Assessing Drug Treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(4): 1565–1570.

Irving, A A, K Yoshimi, M L Hart, T Parker, L Clipson, M R Ford, T Kuramoto, W F Dove, J M Amos-Landgraf

2014 The Utility of Apc-Mutant Rats in Modeling Human Colon Cancer. *Disease Models & Mechanisms* 7(11): 1215–1225.

Jackman, R J, C W Mayo

1951 The Adenoma-Carcinoma Sequence in Cancer of the Colon. *Surgery, Gynecology & Obstetrics* 93(3): 327–330.

Jackson, E L

2001 Analysis of Lung Tumor Initiation and Progression Using Conditional Expression of Oncogenic K-Ras. *Genes & Development* 15(24): 3243–3248.

2005 The Differential Effects of Mutant p53 Alleles on Advanced Murine Lung Cancer. *Cancer Research* 65(22): 10280–10288.

Jemal, A, F Bray, M M Center, J Ferlay, E Ward, D Forman

2011 Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61(2): 69–90.

Johnson, L, D Greenbaum, K Cichowski, K Mercer, E Murphy, E Schmitt, R T Bronson, H Umanoff, W Edelmann, R Kucherlapati, T Jacks

1997 K-Ras Is an Essential Gene in the Mouse with Partial Functional Overlap with N-Ras. *Genes & Development* 11(19): 2468–2481.

Johnson, L, K Mercer, D Greenbaum, R T Bronson, D Crowley, D A Tuveson, T Jacks

2001 Somatic Activation of the K-Ras Oncogene Causes Early Onset Lung Cancer in Mice. *Nature* 410(6832): 1111–1116.

Jonkers, J., R. Meuwissen, H. van der Gulden, H Peterse, M van der Valk, A Berns

2001 Synergistic Tumor Suppressor Activity of BRCA2 and p53 in a Conditional Mouse Model for Breast Cancer. *Nature Genetics* 29(4): 418–425.

Kaatsch, P, C Spix, A Katalinic, S Hentschel, S Luttmann, C Stegmaier, S Caspritz, M Christ, A Ernst, J Folkerts, J Hansmann, S Klein, K Kranzhöfer, B Kunz, K Manegold, A Penzkofer, K Treml, S Weg-Remers, K Wittenberg, N Baras, B Barnes, J Bertz, N Buttmann-Schweiger, S Dahm, J Fiebig, M Franke, M Kraywinkel, A Wienecke, U Wolf, Robert-Koch-Institut
2015 Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland
2011/2012.

Kay, M A

2011 State-of-the-Art Gene-Based Therapies: The Road Ahead. Nature Reviews. Genetics
12(5): 316–328.

Kinzler, K W, B Vogelstein

1996 Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. Cell 87(2): 159–170.

Koera, K, K Nakamura, K Nakao, J Miyoshi, K Toyoshima, T Hatta, H Otani, A Aiba, M
Katsuki

1997 K-Ras Is Essential for the Development of the Mouse Embryo. Oncogene 15(10):
1151–1159.

Krasinskas, A M

2011 EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. Pathology Research International 2011: 1–
6.

Kuraguchi, M, X-P Wang, R T Bronson, R Rothenberg, N Y Ohene-Baah, J J Lund, M
Kucherlapati, R L Maas, R Kucherlapati

2006 Adenomatous Polyposis Coli (APC) Is Required for Normal Development of Skin and
Thymus. PLoS Genetics 2(9): e146.

Lane, D P, L V Crawford

1979 T Antigen Is Bound to a Host Protein in SY40-Transformed Cells. Nature 278(5701):
261–263.

Lawrence, J, E Rohren, J Provenzale

2010 PET/CT Today and Tomorrow in Veterinary Cancer Diagnosis and Monitoring:
Fundamentals, Early Results and Future Perspectives. Veterinary and Comparative
Oncology: no–no.

Levine, A J

1997 p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88(3): 323–331.

Liu, H, L Jin, S B S Koh, I Atanasov, S Schein, L Wu, Z Hong Zhou

2010 Atomic Structure of Human Adenovirus by Cryo-EM Reveals Interactions among Protein Networks. *Science (New York, N.Y.)* 329(5995): 1038–1043.

Liu, J, C Zhang, W Hu, Z Feng

2013 Tumor Suppressor p53 and Its Mutants in Cancer Metabolism. *Cancer Letters*.

Marino, S, M Vooijs, H van der Gulden, J Jonkers, A Berns

2000 Induction of Medulloblastomas in p53-Null Mutant Mice by Somatic Inactivation of Rb in the External Granular Layer Cells of the Cerebellum. *Genes & Development* 14(8): 994–1004.

McEntee, M F, K A Brenneman

1999 Dysregulation of Beta-Catenin Is Common in Canine Sporadic Colorectal Tumors. *Veterinary Pathology* 36(3): 228–236.

Metzger, D, R Feil

1999 Engineering the Mouse Genome by Site-Specific Recombination. *Current Opinion in Biotechnology* 10(5): 470–476.

Morello, E, M Martano, C Squassino, S Iussich, R Caccamo, F Sammartano, S Zabarino, C Bellino, G Pisani

2008 Transanal Pull-through Rectal Amputation for Treatment of Colorectal Carcinoma in 11 Dogs. *Veterinary Surgery: VS* 37(5): 420–426.

Morton, J P, P Timpson, S A Karim, R A Ridgway, D Athineosa, B Doylea, N B Jamiesonb, K A Oienb, A M Lowyc, V G Bruntond, M C Framed, T R Jeffry Evansa, O J Sansoma

2009 Mutant p53 Drives Metastasis and Overcomes Growth Arrest/senescence in Pancreatic Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(1): 246–251.

Mouse Genome Sequencing Consortium, R H Waterston, K Lindblad-Toh, E Birney, J Rogers, JF Abril, P Agarwal, R Agarwala, R Ainscough, M Alexandersson, P An, S E Antonarakis, J Attwood, R Baertsch, J Bailey, K Barlow, S Beck, E Berry, B Birren, T Bloom, P Bork, M Botcherby, N Bray, M R Brent, D G Brown, S D Brown, C Bult, J Burton, J Butler, R D Campbell, P Carninci, S Cawley, F Chiaromonte, A T Chinwalla, D M Church, M Clamp, C Clee, F S Collins, L L Cook, R R Copley, A Coulson, O Couronne, J Cuff, V Curwen, T Cutts, M Daly, R David, J Davies, K D Delehaunty, J Deri, E T Dermitzakis, C Dewey, N J Dickens, M Diekhans, S Dodge, I Dubchak, D M Dunn, S R Eddy, L Elnitski, R D Emes, P Eswara, E Eyra, A Felsenfeld, G A Fewell, P Flicek, K Foley, W N Frankel, L A Fulton, R S Fulton, T S Furey, D Gage, R A Gibbs, G Glusman, S Gnerre, N Goldman, L Goodstadt, D Grafham, T A Graves, E D Green, S Gregory, R Guigó, M Guyer, R C Hardison, D Haussler, Y Hayashizaki, L W Hillier, A Hinrichs, W Hlavina, T Holzer, F Hsu, A Hua, T Hubbard, A Hunt, I Jackson, D B Jaffe, L S Johnson, M Jones, T A Jones, A Joy, M Kamal, E K Karlsson, D Karolchik, A Kasprzyk, J Kawai, E Keibler, C Kells, W J Kent, A Kirby, D L Kolbe, I Korf, R S Kucherlapati, E J Kulbokas, D Kulp, T Landers, J P Leger, S Leonard, I Letunic, R Levine, J Li, M Li, C Lloyd, S Lucas, B Ma, D R Maglott, E R Mardis, L Matthews, E Mauceli, J H Mayer, M McCarthy, W R McCombie, S McLaren, K McLay, J D McPherson, J Meldrim, B Meredith, J P Mesirov, W Miller, T L Miner, E Mongin, K T Montgomery, M Morgan, R Mott, J C Mullikin, D M Muzny, W E Nash, J O Nelson, M N Nhan, R Nicol, Z Ning, C Nusbaum, M J O'Connor, Y Okazaki, K Oliver, E Overton-Larty, L Pachter, G Parra, K H Pepin, J Peterson, P Pevzner, R Plumb, C S Pohl, A Poliakov, T C Ponce, C P Ponting, S Potter, M Quail, A Reymond, B A Roe, K M Roskin, E M Rubin, A G Rust, R Santos, V Sapojnikov, B Schultz, J Schultz, M S Schwartz, S Schwartz, C Scott, S Seaman, S Searle, T Sharpe, A Sheridan, R Shownkeen, S Sims, J B Singer, G Slater, A Smit, D R Smith, B Spencer, A Stabenau, N Stange-Thomann, C Sugnet, M Suyama, G Tesler, J Thompson, D Torrents, E Trevaskis, J Tromp, C Ucla, A Ureta-Vidal, J P Vinson, A C Von Niederhausern, C M Wade, M Wall, R J Weber, R B Weiss, M C Wendl, A P West, K Wetterstrand, R Wheeler, S Whelan, J Wierzbowski, D Willey, S Williams, R K Wilson, E Winter, K C Worley, D Wyman, S Yang, S P Yang, E M Zdobnov, M C Zody, E S Lander

2002 Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome. *Nature* 420(6915): 520–562.

Muzny, D M, M N Bainbridge, K Chang, H H Dinh, J A Drummond, G Fowler, C L Kovar, L R Lewis, M B Morgan, I F Newsham, J G Reid, J Santibanez, E Shinbrot, L R Trevino, Y Q Wu, M Wang, P Gunaratne, L A Donehower, C J Creighton, D A Wheeler, R A Gibbs, M S Lawrence, D Voet, R Jing, K Cibulskis, A Sivachenko, P Stojanov, A McKenna, E S Lander, S Gabriel, G Getz, L Ding, R S Fulton, D C Koboldt, T Wylie, J Walker, D J Dooling, L Fulton, K D Delehaunty, C C Fronick, R Demeter, E R Mardis, R K Wilson, A Chu, H J Chun, A J Mungall, E Pleasance, A Robertson, D Stoll, M Balasundaram, I Birol, Y S Butterfield, E Chuah, R J Coope, N Dhalla, R Guin, C Hirst, M Hirst, R A Holt, D Lee, H I Li, M Mayo, R A Moore, J E Schein, J R Slobodan, A Tam, N Thiessen, R Varhol, T Zeng, Y Zhao, S J Jones, M A Marra, A J Bass, A H Ramos, G Saksena, A D Cherniack, S E Schumacher, B Tabak, S L Carter, N H Pho, H Nguyen, R C Onofrio, A Crenshaw, K Ardlie, R Beroukhim, W Winckler, G Getz, M Meyerson, A Protopopov, J Zhang, A Hadjipanayis, E Lee, R Xi, L Yang, X Ren, H Zhang, N Sathiamoorthy, S Shukla, P C Chen, P Haseley, Y Xiao, S Lee, J Seidman, L Chin, P J Park, R Kucherlapati, J T Auman, K A Hoadley, Y Du, M D Wilkerson, Y Shi, C Liquori, S Meng, L Li, Y J Turman, M D Topal, D Tan, S Waring, E Buda, J Walsh, C D Jones, P A Mieczkowski, D Singh, J Wu, A Gulabani, P Dolina, T Bodenheimer, A P Hoyle, J V Simons, M Soloway, L E Mose, S R Jefferys, S Balu, B D O'Connor, J F Prins, D Y Chiang, D Hayes, C M Perou, T Hinoue, D J Weisenberger, D T Maglinte, F Pan, B P Berman, D J Van Den Berg, H Shen, T Jr Triche, S B Baylin, P W Laird, G Getz, M Noble, D Voet, G Saksena, N Gehlenborg, D DiCara, J Zhang, H Zhang, C J Wu, S Y Liu, S Shukla, M S Lawrence, L Zhou, A Sivachenko, P Lin, P Stojanov, R Jing, R W Park, M D Nazaire, J Robinson, H Thorvaldsdottir, J Mesirov, P J Park, L Chin, V Thorsson, S M Reynolds, B Bernard, R Kreisberg, J Lin, L Iype, R Bressler, T Erkkilä, M Gundapuneni, Y Liu, A Norberg, T Robinson, D Yang, W Zhang, I Shmulevich, J J de Ronde, N Schultz, E Cerami, G Ciriello, A P Goldberg, B Gross, A Jacobsen, J Gao, B Kaczkowski, R Sinha, B Aksoy, Y Antipin, B Reva, R Shen, B S Taylor, T A Chan, M Ladanyi, C Sander, R Akbani, N Zhang, B M Broom, T Casasent, A Unruh, C Wakefield, S R Hamilton, R Cason, K A Baggerly, J N Weinstein, D Haussler, C C Benz, J M Stuart, S C Benz, J Sanborn, C J Vaske, J Zhu, C Szeto, G K Scott, C Yau, S Ng, T Goldstein, K Ellrott, E Collisson, A E Cozen, D Zerbino, C Wilks, B Craft, P Spellman, R Penny, T Shelton, M Hatfield, S Morris, P Yena, C Shelton, M Sherman, J Paulauskis, J M Gastier-Foster, J Bowen, N C Ramirez, A Black, R Pyatt, L Wise, P White, M Bertagnolli, J Brown, T A Chan, G C Chu, C Czerwinski, F Denstman, R Dhir, A Dörner, C S Fuchs, J G Guillem, M Iacocca, H Juhl, A Kaufman, B 3rd Kohl, X Van Le, M C Mariano, E N Medina, M Meyers, G M Nash, P B Paty, N Petrelli, B Rabeno, W G Richards, D Solit, P Swanson, L Temple, J E Tepper, R Thorp, E Vakiani, M R Weiser, J E Willis, G Witkin, Z Zeng, M J Zinner, C Zornig, M A Jensen, R Sfeir, A B Kahn, A L Chu, P Kothiyal, Z Wang, E

E Snyder, J Pontius, T D Pihl, B Ayala, M Backus, J Walton, J Whitmore, J Baboud, D L Berton, M C Nicholls, D Srinivasan, R Raman, S Girshik, P A Kigonya, S Alonso, R N Sanbhadti, S P Barletta, J M Greene, D A Pot, K R Shaw, L A Dillon, K Buetow, T Davidsen, J A Demchok, G Eley, M Ferguson, P Fielding, C Schaefer, M Sheth, L Yang, M S Guyer, B A Ozenberger, J D Palchik, J Peterson, H J Sofia, E Thomson
2012 Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer. *Nature* 487(7407): 330–337.

Nagy, A

2000 Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring. *Genesis* (New York, N.Y.: 2000) 26(2): 99–109.

Nandan, M O, V W Yang

2010 Genetic and Chemical Models of Colorectal Cancer in Mice. *Current Colorectal Cancer Reports* 6(2): 51–59.

Nemerow, G R, P L Stewart, V S Reddy

2012 Structure of Human Adenovirus. *Current Opinion in Virology* 2(2): 115–121.

O'Connell, J B, M A Maggard, C Y Ko

2004 Colon Cancer Survival Rates with the New American Joint Committee on Cancer Sixth Edition Staging. *Journal of the National Cancer Institute* 96(19): 1420–1425.

Olive, K P, D A Tuveson, Z C Ruhe, B Yin, N A Willis, R T Bronson, D Crowley, T Jacks

2004 Mutant p53 Gain of Function in Two Mouse Models of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell* 119(6): 847–860.

Onuma, K, M Ochiai, K Orihashi, M Takahashib, T Imaib, H Nakagamaa, Y Hippoa,

2013 Genetic Reconstitution of Tumorigenesis in Primary Intestinal Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(27): 11127–11132.

Paoloni, M C, C Khanna

2007 Comparative Oncology Today. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 37(6): 1023–1032; v.

Paoloni, M C, D G Penninck, A S Moore

2002 Ultrasonographic and Clinicopathologic Findings in 21 Dogs with Intestinal Adenocarcinoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound: The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 43(6): 562–567.

Paoloni, M, C Khanna

2008 Translation of New Cancer Treatments from Pet Dogs to Humans. *Nature Reviews Cancer* 8(2): 147–156.

Patnaik, A K, A I Hurvitz, G F Johnson

1977 Canine Gastrointestinal Neoplasms. *Veterinary Pathology* 14(6): 547–555.

Patnaik, A K, S K Liu, G F Johnson

1976 Feline Intestinal Adenocarcinoma. A Clinicopathologic Study of 22 Cases. *Veterinary Pathology* 13(1): 1–10.

Powell, S M, N Zilz, Y Beazer-Barclay, T M Bryan, S R Hamilton, S N Thibodeau, B

Vogelstein, K W Kinzler

1992 APC Mutations Occur Early during Colorectal Tumorigenesis. *Nature* 359(6392): 235–237.

Reddy, V S, S Kundhavai Natchiar, P L Stewart, G R Nemerow

2010 Crystal Structure of Human Adenovirus at 3.5 Å Resolution. *Science (New York, N.Y.)* 329(5995): 1071–1075.

Robanus-Maandag, E C, P J Koelink, C Breukel, D C F Salvatori, S C Jagmohan-Changur, C A J Bosch, H W Verspaget, P Devilee, R Fodde, R Smits

2010 A New Conditional Apc-Mutant Mouse Model for Colorectal Cancer. *Carcinogenesis* 31(5): 946–952.

Roper, J, K E Hung

2012 Priceless GEMMs: Genetically Engineered Mouse Models for Colorectal Cancer Drug Development. *Trends in Pharmacological Sciences* 33(8): 449–455.

Rowe, W P, R J Huebner, L K Gilmore, R H Parrott, T G Ward

1953 Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 84(3): 570–573.

Sauer, B, N Henderson

1988 Site-Specific DNA Recombination in Mammalian Cells by the Cre Recombinase of Bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(14): 5166–5170.

1989 Cre-Stimulated Recombination at loxP-Containing DNA Sequences Placed into the Mammalian Genome. *Nucleic Acids Research* 17(1): 147–161.

Sharpless, N E, R A Depinho

2006 The Mighty Mouse: Genetically Engineered Mouse Models in Cancer Drug Development. *Nature Reviews. Drug Discovery* 5(9): 741–754.

Shibata, H

1997 Rapid Colorectal Adenoma Formation Initiated by Conditional Targeting of the Apc Gene. *Science* 278(5335): 120–123.

Singh, M, C L Murriel, L Johnson

2012 Genetically Engineered Mouse Models: Closing the Gap between Preclinical Data and Trial Outcomes. *Cancer Research* 72(11): 2695–2700.

Slawienski, M J, G E Mauldin, G N Mauldin, A K Patnaik

1997 Malignant Colonic Neoplasia in Cats: 46 Cases (1990-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211(7): 878–881.

Smith, G, R Bounds, H Wolf, R J C Steele, F A Carey, C R Wolf

2010 Activating K-Ras Mutations Outwith “Hotspot” Codons in Sporadic Colorectal Tumours - Implications for Personalised Cancer Medicine. *British Journal of Cancer* 102(4): 693–703.

Snijder, J, V S Reddy, E R May, W H Roosa, G R Nemerowb, G J L Wuitea

2013 Integrin and Defensin Modulate the Mechanical Properties of Adenovirus. *Journal of Virology* 87(5): 2756–2766.

Sternberg, N, D Hamilton, R Hoess

1981 Bacteriophage P1 Site-Specific Recombination. II. Recombination between loxP and the Bacterial Chromosome. *Journal of Molecular Biology* 150(4): 487–507.

Szylberg, Ł, M Janiczek, A Popiel, A Marszałek

2015 Large Bowel Genetic Background and Inflammatory Processes in Carcinogenesis-- Systematic Review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University* 24(4): 555–563.

Tang, J, S Le, L Sun, X Yan, M Zhang, J MacLeod, B LeRoy, N Northrup, A Ellis, T J Yeatman, Y Liang, M E Zwick, S Zhao

2010 Copy Number Abnormalities in Sporadic Canine Colorectal Cancers. *Genome Research* 20(3): 341–350.

Tuveson, D A, A T Shaw, N A Willis, D P Silver, E L Jackson, S Chang, K L Mercer, R Grochow, H Hock, D Crowley, S R Hingorani, T Zaks, C King, M A Jacobetz, L Wang, R T Bronson, S H Orkin, R A DePinho, T Jacks

2004 Endogenous Oncogenic K-ras(G12D) Stimulates Proliferation and Widespread Neoplastic and Developmental Defects. *Cancer Cell* 5(4): 375–387.

Valerius, K D, B E Powers, M A McPherron, J M Hutchison, F A Mann, S J Withrow

1997 Adenomatous Polyps and Carcinoma in Situ of the Canine Colon and Rectum: 34 Cases (1982-1994). *Journal of the American Animal Hospital Association* 33(2): 156–160.

Vogelstein, B, E R Fearon, S R Hamilton, S E Kern, A C Preisinger, M Leppert, A M M Smits, J L Bos

1988 Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *The New England Journal of Medicine* 319(9): 525–532.

Weitz, J, M Koch, J Debus, T Höhler, P R Galle, M W Büchler

2005 Colorectal Cancer. *Lancet* 365(9454): 153–165.

Winawer, S J, A G Zauber, M N Ho, M J O'Brien, L S Gottlieb, S S Sternberg, J D Waye, M Schapiro, J H Bond, J F Panish, F Ackroyd, M Shike, R C Kurtz, L Hornsby-Lewis, H Gerdes, E T Stewart, the National Polyp Study Workgroup

1993 Prevention of Colorectal Cancer by Colonoscopic Polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. The New England Journal of Medicine 329(27): 1977–1981.

Wolf, J C, P E Ginn, B Homer, L E Fox, I D Kurzman

1997 Immunohistochemical Detection of p53 Tumor Suppressor Gene Protein in Canine Epithelial Colorectal Tumors. Veterinary Pathology 34(5): 394–404.

Xue, Y, R Johnson, M Desmet, P W Snyder, J C Fleet

2010 Generation of a Transgenic Mouse for Colorectal Cancer Research with Intestinal Cre Expression Limited to the Large Intestine. Molecular Cancer Research: MCR 8(8): 1095–1104.

Youmans, L, C Taylor, E Shin, A Harrell, A E Ellis, B Séguin, X Ji, S Zhao

2012 Frequent Alteration of the Tumor Suppressor Gene APC in Sporadic Canine Colorectal Tumors. PloS One 7(12): e50813.

9. Anhang

9.1. Equipment

Einmal-Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmal-Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PCR Thermocycler System	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PD 10 -Aufreinigungssäule	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Pipetten	Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland
Schermaschine	Aesculap, Suhl, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV- Transilluminator	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortex	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
anatomische Pinzetten	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
chirurgische Schere	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
weiche Darmklemmen	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Yasargil Gefäßklemme	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Flexibler Teflonschlauch	Smith Medical GmbH, Grasbrunn, Deutschland
Nadelhalter	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Faden (PDS II 5-0)	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Autoclip Kit	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wärmeplatte	Labotect, Göttingen, Deutschland
Koloskop	Storz, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

9.2. Chemikalien

Agarose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Augensalbe (Bepanthen®)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Buprenorphin (Temgesic®)	Schering Plough, Kenilworth, USA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNA loading dye	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gel red	Biotium, Fremont, USA
Isofluran	CP Pharma, Burgdorf, Deutschland
O`GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin EDTA	PAA, Pasching, Österreich

9.3. Enzyme

Proteinase

Roche, Mannheim, Deutschland

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Sebastian Schölch für die Überlassung des interessanten Themas, die kompetente fachliche Betreuung, die immer geduldige Beantwortung aller Fragen und die positiven, aufbauenden Worte.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer von der Klinik für Kleintiere in Gießen bedanke ich mich für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich, welche stets unkompliziert und freundlich war.

Danke an alle Mitarbeiter des Labors, vor allem an Melanie, Nicole und Marzena, woraus sich eine schöne Freundschaft entwickelt hat. Außerdem möchte ich mich bei Sascha, Mareen, Markus, Tizi, Michi, Maria und Praveen bedanken, dass sie mir bei Problemen immer weitergeholfen haben.

Dem gesamten Team vom IBF möchte ich für die gewissenhafte und liebevolle Pflege der Mäuse danken.

Vielen Dank Sarah für deine Unterstützung im DKFZ und auch dafür, dass du hinterher für Fragen zu erreichen warst.

Ein großer Dank gebührt meiner Schwester Nina, die mir bei allen Fragen zur Formatierung hilfreich und geduldig zur Seite stand.

Meinen Eltern möchte ich aus tiefsten Herzen für ihre liebevolle Fürsorge und grenzenlose Unterstützung danken. Ohne sie wäre weder mein Studium noch das Anfertigen dieser Dissertation möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Dennis bedanken, der mir immer zur Seite steht und mich stets motiviert hat, diese Arbeit fertig zu schreiben.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Linda Amtsfeld



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6627-7



Photo cover: © grafikplusfoto @ photolia.de